

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE  
PRÉSENTÉE À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE

PAR  
CHANTALE CHABOT

ASPECTS DÉVELOPPEMENTAUX DE LA RÉGULATION DES RÉCEPTEURS  
GLUTAMATERGIQUES DE TYPE AMPA PAR LA PHOSPHOLIPASE A<sub>2</sub>  
DANS LE CERVEAU

MAI 2000

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## Sommaire

On sait, depuis les années 1950, que l'hippocampe joue un rôle primordial dans la mémoire. Si l'on ignore comment les neurones de cette structure du cerveau contribuent au stockage des souvenirs, il existe toutefois des données expérimentales supportant le rôle du neurotransmetteur glutamate (et de ses récepteurs) dans les processus de mémorisation. En effet, selon les neurobiologistes, ce sont les récepteurs du neurotransmetteur glutamate qui seraient à l'origine des modifications synaptiques que l'on observe après la stimulation électrique répétée des neurones de l'hippocampe. En outre, de nombreuses études ont démontré que l'apparition de la potentialisation à long terme (LTP), un modèle électrophysiologique de mémorisation, nécessite la contribution des divers sous-types de récepteurs glutamatergiques. Or, dans la région CA<sub>1</sub> de l'hippocampe, l'apparition de la LTP résulterait essentiellement de l'activation des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) pour le glutamate et il fût mis en évidence que l'influx de calcium qui résulte de l'activation de ce complexe récepteur représente l'étape cruciale à l'induction de la LTP. En revanche, le maintien de ce phénomène semble être lié à des modifications de la réponse électrophysiologique assurée par les récepteurs  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate (AMPA); un autre sous-type de récepteurs glutamatergiques. Selon toute vraisemblance, ces modifications des

récepteurs AMPA sont produites suite à l'action d'enzymes postsynaptiques dont l'activité est contrôlée par l'ion calcium. L'objectif principal du présent travail consiste à mettre en lumière l'importance de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) comme mécanisme biochimique endogène susceptible de moduler les aspects biochimiques des récepteurs AMPA pour le glutamate. Notre première série d'études, effectuée sur des préparations de synaptoneurosomes (une suspension de synapses), a permis de démontrer que la liaison du <sup>3</sup>H-AMPA à ses récepteurs se voit accentuée suite à l'activation de la PLA<sub>2</sub> endogène par la mellétine. Cet effet de la PLA<sub>2</sub> est fort probablement attribuable à un changement de l'affinité du récepteur AMPA et est grandement altéré dans les préparations de synaptoneurosomes provenant d'animaux en bas âges. Cela étant, nous avons conduit des expériences afin de mettre en relation les niveaux de modulation du récepteur AMPA et de LTP lors de la période postnatale. Nous avons été en mesure de démontrer que la régulation de l'affinité des récepteurs AMPA et ce, tant par la mellétine que par la dépolarisation chimique, semble apparaître entre les jours 10 et 15 de la période postnatale chez le raton. La contribution de la PLA<sub>2</sub> dans la LTP est fortement suggérée par nos études électrophysiologiques démontrant une étroite corrélation entre la capacité des neurones de l'hippocampe à générer la LTP et les niveaux de régulation des récepteurs AMPA au cours du développement. On sait, par ailleurs, que les neurones de l'hippocampe produisent des phénomènes de dépression à long terme (LTD) de la transmission synaptique qui, selon plusieurs experts, serait liés à l'élimination des souvenirs. Or, il a été démontré que le maintien de la LTD peut, à l'instar de la LTP, se voir affecté par les inhibiteurs de la PLA<sub>2</sub>, ce qui laisse présager la possibilité que

l'enzyme PLA<sub>2</sub> peut être en mesure d'assurer une modulation différente des récepteurs AMPA selon son niveau d'activité. Dans ce contexte, quand on traite des synaptoneurosomes avec des concentrations croissantes de PLA<sub>2</sub>, le récepteur AMPA voit son affinité réduite aux basses concentrations de l'enzyme et augmentée aux plus fortes concentrations. La modulation à la baisse de l'affinité du récepteur semble assurée par la production de métabolites de l'acide arachidonique dérivant de la voie lipoxigénase. En revanche, la hausse de l'affinité du récepteur AMPA par les fortes concentrations de l'enzyme apparaît indépendante de l'action de métabolites de l'acide arachidonique. Nos études ont aussi démontré que l'activité des protéines kinases, notamment la protéine kinase C, participe à la modulation du récepteur AMPA par la PLA<sub>2</sub>. Finalement, en terme électrophysiologique, nous avons établi que la LTD dans l'hippocampe est grandement altérée par des inhibiteurs de lipoxigénases, tandis que la LTP ne l'est pas. Ainsi, nos résultats suggèrent que les modifications des récepteurs AMPA par la PLA<sub>2</sub> soient étroitement liées aux changements des propriétés électrophysiologiques des neurones de l'hippocampe. Un modèle biochimique faisant intervenir la PLA<sub>2</sub> comme mécanisme cellulaire de la plasticité neuronale est ici présenté.

## Table des matières

SOMMAIRE .....	I
TABLE DES MATIÈRES .....	IV
LISTE DES ABBRÉVIATIONS .....	VI
LISTE DES FIGURES .....	VIII
REMERCIEMENTS .....	X
CHAPITRE 1 – INTRODUCTION .....	1
1.1- Mémorisation : rôle de l'hippocampe .....	1
1.1.1 – Historique .....	1
1.1.2 – Rôle de l'hippocampe .....	3
1.1.3 – La mémoire et l'adaptation des neurones .....	5
1.1.4 – La LTP comme modèle d'étude de la mémoire .....	7
1.2 – Aspects neuropharmacologiques de la LTP .....	9
1.2.2 – Fonctionnement d'une synapse .....	12
1.2.3 – Pharmacologie des récepteurs au glutamate .....	13
1.2.4 – Induction de la LTP .....	17
1.2.5 – Développement de la LTP .....	23
1.2.6 – Expression et maintien de la LTP .....	24
1.3 – La régulation des récepteurs AMPA .....	28
1.3.1 – Rôle des protéines de fusion membranaire .....	28
1.3.2 – Rôle des kinases .....	33
1.3.3 – Rôle des protéases .....	35
1.3.4 – Rôle des phospholipases .....	37
1.4 – Contrôle bidirectionnel de la fonction glutamatergique .....	41
CHAPITRE 2 – HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS .....	44

CHAPITRE 3 – RÉSULTATS .....	48
Contexte théorique .....	48
Article 3.1 : Melittin increases AMPA receptor affinity in rat brain synaptoneurosomes .....	50
Abstract .....	51
Introduction .....	52
Materials and methods .....	55
Results .....	56
Discussion .....	65
References .....	69
Contexte théorique .....	73
Article 3.2 : Developmental changes in depolarization-mediated AMPA receptor modifications and potassium-induced long-term potentiation .....	74
Abstract .....	75
Introduction .....	77
Materials and methods .....	80
Results .....	82
Discussion .....	88
References .....	92
Contexte théorique .....	97
Article 3.3 : Bidirectional modulation of AMPA receptor properties by exogenous phospholipase A <sub>2</sub> in the hippocampus .....	98
Abstract .....	99
Introduction .....	101
Materials and methods .....	105
Results .....	108
Discussion .....	124
Conclusion .....	132
References .....	134
CHAPITRE 4 – DISCUSSION GÉNÉRALE .....	140
CHAPITRE 6 – RÉFÉRENCES .....	151

## Liste des abréviations

<b>AA</b>	Acide arachidonique
<b>AMPA</b>	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionique
<b>AP5</b>	D-2-amino-5-phosphonopentanoate
<b>A-CaMKII</b>	Protéine kinase II $\alpha$ -Ca <sup>2+</sup> -calmoduline
<b>ACSF</b>	Artificial cerebrospinal fluid
<b>BAIC</b>	Baicalein
<b>BPB</b>	Bromure de bromophénacyl
<b>8-BRO</b>	8-bromo-cyclic AMP
<b>BSA</b>	Bovine serum albumine
<b>CDC</b>	Cinnamyl-3,4-dihydroxy- $\alpha$ -cyanocinnamate
<b>CNQX</b>	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
<b>CPP</b>	(2-carboxypiperazine-4-yl) propyl-1-phosphonic acid
<b>DNQX</b>	6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione
<b>EEG</b>	Électroencéphalogramme
<b>FORS</b>	Forskolin
<b>GLU</b>	Glutamate
<b>INDO</b>	Indométhacine
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositols triphosphates
<b>L-AP3</b>	L-2-amino-3-phosphonopropanoate
<b>LTD</b>	Long term depression
<b>LTP</b>	Long term potentiation
<b>MK-801</b>	5-méthyl-10,11-dihydro-5H-dibenzocyclohepten-5,10-imine maleate
<b>NEM</b>	N-ethylmaleimide
<b>NDGA</b>	Nordihydroguaiaretic acid
<b>NMDA</b>	N-méthyl-D-aspartate
<b>NSF</b>	N-ethylmaleimide-sensitive
<b>OA</b>	okadaic acid
<b>PCT</b>	Potentialisation à court terme
<b>PDBu</b>	Phorbol dibutyrate
<b>4-<math>\alpha</math>PDD</b>	4 $\alpha$ -phorbol-12,13-didecanoate
<b>PKC</b>	Protéine kinase C
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Phospholipase A <sub>2</sub>
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PMA</b>	Phorbol 12-myristate, 13-acetate



<b>PND</b>	Postnatal day
<b>PPSE</b>	Potentiel postsynaptique exciteur
<b>PPT</b>	Potentialisation post-tétanique
<b>PS</b>	Phosphatidylsérine
<b>PSD</b>	Post-synaptic density
<b>SBF</b>	Stimulation de basse fréquence
<b>SHF</b>	Stimulation de haute fréquence
<b>SNC</b>	Système nerveux central
<b>SR</b>	Stratum radiatum
<b>t-ACPD</b>	(±)-1-aminocyclopentane-trans-1,3-dicarboxylic acid
<b>TBS</b>	Theta burst stimulation
<b>TCP</b>	N-(1-[thienyl]cyclohexyl)piperidine
<b>V<sub>m</sub></b>	Voltage membranaire

## Liste des figures et des tableaux

### Figure

1	Région temporale d'un cerveau de rat .....	4
2	La synapse de Hebb .....	6
3	Stimulation électrique des neurones de l'hippocampe .....	10
4	Cascades de réactions chimiques assurant la neurotransmission .....	13
5	Rôle des récepteurs NMDA dans la plasticité neuronale .....	15
6	Mécanisme d'induction de la LTP .....	20

### Article 1

1	Effect of melittin treatment on the binding of [ <sup>3</sup> H]AMPA in rat synaptoneurosomes .....	57
2	Effect of temperature on melittin-induced increase in [ <sup>3</sup> H]AMPA binding in rat synaptoneurosomes .....	58
3	Effect of melittin treatment on the binding properties of AMPA receptors in rat synaptoneurosomes .....	60
4	Effect of different inhibitors of the arachidonic acid cascade on the melittin-induced increase in [ <sup>3</sup> H]AMPA binding in rat synaptoneurosomes .....	62
5	Effect of melittin-induced increase in [ <sup>3</sup> H]AMPA binding in developing and mature rat synaptoneurosomes .....	64

## Article 2

1	Effect of KCL-induced depolarization on [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding in developing rat synaptoneurosomes .....	82
2	Effect of development on KCL-induced LTP in CA1 of the hippocampus ...	84
3	Effect of melittin on [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding in developing rat synaptoneurosomes .....	85
4	Effect of melittin on [ $^3\text{H}$ ]arachidonate release in rat synaptoneurosomes .....	87

## Article 3

1	Effect of exogenous phospholipases on $^3\text{H}$ -AMPA binding in rat synaptoneurosomes .....	110
2	Effect of lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors on $\text{PLA}_2$ -induced changes in $^3\text{H}$ -AMPA binding in rat synaptoneurosomes .....	112
3	Effect of AA and HPETE by-products on $^3\text{H}$ -AMPA binding in rat synaptoneurosomes .....	115
4	Effect of lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors on LTD and LTP in area CA <sub>1</sub> of the hippocampus .....	117
5	Effect of calcium on $\text{PLA}_2$ -induced changes in $^3\text{H}$ -AMPA binding in rat synaptoneurosomes .....	119
6	Effect of phosphorylating agents on $\text{PLA}_2$ -induced changes in $^3\text{H}$ -AMPA binding and $^3\text{H}$ -arachidonate release in rat synaptoneurosomes .....	121
7	A biochemical model integrating phosphorylation processes and $\text{PLA}_2$ activation for mediating LTD and LTP .....	133

## Tableaux

1	Principaux ligands utilisés .....	16
2	Classification des formes de plasticité synaptique .....	28

## Remerciements

J'aimerais exprimer de ma gratitude pour remercier les gens qui ont cheminé à mes côtés tout au long de mes études graduées et qui m'ont permis de réaliser de grandes choses. À mon directeur de thèse, le Dr Guy Massicotte, je tiens à dire mille mercis pour son support constant et son appui à mon égard durant mon séjour dans son laboratoire de recherche. Merci pour sa confiance, ses judicieux conseils qui ont été plus qu'appréciés.

J'ai eu la chance de travailler dans une équipe où régnait la camaraderie. Joël, Luc, Julie, Brigitte et Caroline, merci pour les échanges scientifiques et ces innombrables bons moments. Un merci bien spécial aux Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche, Intervention spéciale ainsi que le Dr Massicotte pour la confiance qu'ils m'ont témoigné en me supportant financièrement.

Aux membres de ma famille, qui me trouvent courageuse d'être encore à l'école, merci d'avoir respecté mon choix et de m'avoir supporté constamment. En terminant, je

tiens à adresser les derniers mots mais non les moindres à Daniel et Audrey, les deux amours de ma vie. Merci infiniment pour votre support de tous les instants, votre écoute indéfectible, votre grande compréhension et votre confiance sans limite que vous m'avez témoignée. Votre présence à mes côtés n'est vraiment pas étrangère à mon arrivée à bon port.

# Chapitre 1

## Introduction

### 1.1 - Mémorisation: rôle de l'hippocampe

#### 1.1.1 - Historique

Quel siècle a été plus préoccupé de mémoire que le nôtre, qui accumule les photographies, les enregistrements et les banques de données? Mais savons-nous pour autant ce qu'est la mémoire? Cette merveille du monde est aussi la machine la plus complexe de l'univers. La seule qui aime et qui hait. La seule qui cherche à se comprendre. En effet, comprendre la mémoire nécessite, pour les neurobiologistes, de rechercher la *trace* imprimée dans le cerveau par les expériences vécues. Mais que trouve-t-on dans le cerveau?

On a beaucoup dit, et on dit encore souvent, que le cerveau est une *boîte noire*. Ce n'est plus vrai. Même avant l'imagerie médicale et ses fabuleuses machines à regarder

*dans* la tête, on avait une assez bonne idée de son architecture et de son fonctionnement. Les grands psychiatres, neurologues et anatomistes du 19<sup>ème</sup> siècle, le Français Paul Broca et l'Allemand Carl Wernicke entre autres, avaient commencé à regarder dans la boîte crânienne et trouvé quelles régions du cerveau produisaient et comprenaient le langage. Au début de notre siècle, l'Espagnol Santiago Ramon y Cajal avait découvert le support physique de la mémoire, les quelques 100 milliards de neurones et leurs innombrables ramifications. Quelques décennies plus tard, à Montréal, un *certain* Wilder Penfield appliquait des stimulations électriques à la surface du cerveau des patients épileptiques qu'il opérait *à crâne ouvert*. Petit à petit, il établissait une carte du cerveau humain: là, les sensations du doigt gauche ou du bout du nez; ici, la commande du mouvement du pied ou du biceps; ailleurs, la perception des images. Et puis ce fut l'explosion. À partir des années 60, le cerveau mobilise des milliers de cerveaux.

L'étude des amnésies a éclairé la façon dont la mémoire est structurée. Ces études ont donné naissance à une classification de la mémoire, partagée entre mémoire implicite ou procédurale et mémoire explicite ou déclarative. La première est liée à l'exercice ou au savoir-faire. Elle est largement inconsciente et requiert un apprentissage répété. Une fois en place, cette forme de mémoire demeure stable malgré l'absence de répétition. C'est grâce à la mémoire implicite que nous devenons habiles à jouer du piano ou à skier. Nous apprenons sans retenir le souvenir de l'expérience nous ayant amené à cet apprentissage. La mémoire explicite pour sa part, permet de mémoriser les événements

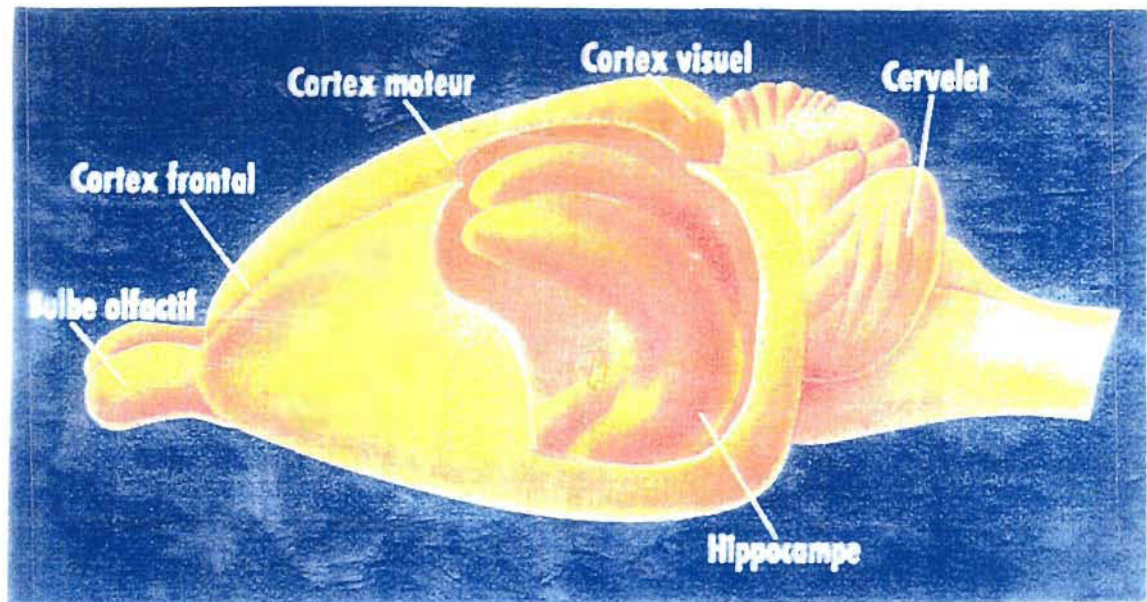
liés à l'apprentissage. C'est une mémoire très consciente, qui peut s'instaurer assez rapidement mais qui semble peu stable. Son contenu peut être exprimé comme *ce que j'ai vu ou ce que j'ai entendu*. Cette distinction entre mémoire implicite et mémoire explicite a permis de faire un pas de plus vers la compréhension des mécanismes cérébraux de la mémoire.

### 1.1.2 - Rôle de l'hippocampe

Une première approche était de rechercher les territoires neuronaux jouant un rôle dans la formation et le stockage des souvenirs. À cette époque, l'ablation chirurgicale d'une partie du lobe temporal constituait l'ultime traitement des patients présentant des crises d'épilepsie sévères, dues à des lésions de cette région du cerveau. Dans les jours qui suivaient l'intervention, certains patients présentaient une amnésie importante. Le plus célèbre de ces cas cliniques est sans doute celui du Dre Brenda Milner qui examina un patient (H. M.), venant de subir une intervention neurochirurgicale pour traiter une épilepsie grave. Après l'opération, les crises s'atténuèrent. Cependant, de graves problèmes de mémoire apparurent: H. M. ne pouvait plus former de nouveaux souvenirs. En revanche, il avait conservé les souvenirs précédant son opération. Sa capacité de transférer de nouvelles connaissances de sa mémoire à court terme à sa mémoire à long terme avait disparue. L'intervention subie par H. M. consistait en une ablation bilatérale



d'une structure du système limbique, l'hippocampe. La figure 1 montre les hippocampes situés au niveau des lobes temporaux.



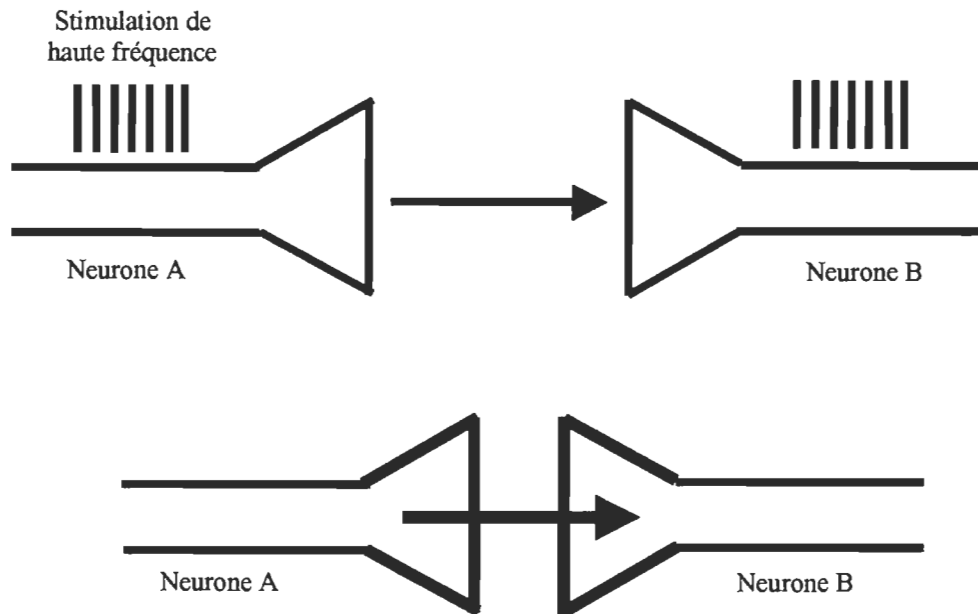
*Figure 1.* Illustration de la région temporale d'un cerveau de rat montrant les deux hippocampes.

D'autres études (Gol et Faibish, 1967; Dejong, Itabashi et Olson, 1968; Van Buren et Borke, 1971; Muramoto, Kuru, Sugishita et Toyokura, 1979; Cummings, Tomiyasu, Read et Benson, 1984; Woods, Schoene et Kneisley, 1982; Zola-Morgan, Squire et Amaral, 1986) confirmèrent l'importance de l'hippocampe dans les phénomènes d'apprentissage et de mémorisation, où il servirait à traiter les informations récemment acquises pendant un certain temps, pour ensuite les transférer progressivement à des

zones plus spécialisées du cortex cérébral, où elles seront emmagasinées de façon permanente.

### 1.1.3 - La mémoire et l'adaptation des neurones

Une autre approche dans l'étude des mécanismes cérébraux de la mémoire, cette fois plus analytique, est de comprendre comment pourraient s'effectuer des opérations simples de mémorisation au niveau des neurones. Un psychologue américain, Donald Olding Hebb (1904-1985), s'est inspiré des travaux de E. Tanzi (Tanzi, 1893) et de S. Ramon y Cajal (Ramon y Cajal, 1911) pour proposer l'existence de synapses (jonctions qui assurent la transmission de l'influx nerveux entre les neurones) *plastiques*, c'est-à-dire très malléables. La figure 2 représente l'hypothèse de Hebb. Lorsque l'axone d'un neurone A active par l'intermédiaire d'une synapse un neurone B et si cette activation réussit de façon répétée à déclencher l'activité du neurone B, alors l'efficacité de la connexion qui unit les deux neurones est par la suite changée. Autrement dit, une même synapse pourrait voir, selon les circonstances, son efficacité augmentée ou affaiblie.



*Figure 2.* La synapse de Hebb. Selon ce modèle l'application d'une stimulation de haute fréquence génère une hausse de la transmission synaptique entre les neurones A et B.

La loi de Hebb constitue depuis, un modèle élémentaire de mémoire pour expliquer comment les synapses peuvent, en fonction de l'expérience, voir leur efficacité renforcée ou affaiblie. En rendant les réseaux de neurones aptes à se modifier, cette plasticité sous-tendrait le stockage des souvenirs dans le cerveau. Mais quels circuits seraient susceptibles de s'auto-organiser, c'est-à-dire de modifier leurs connexions?

#### 1.1.4 – La LTP comme modèle d'étude de la mémoire

Bien que de nombreux scientifiques acceptent l'hypothèse proposant que le phénomène de la potentialisation à long terme soit un mécanisme qui sous-tend les phénomènes d'apprentissage et de mémorisation, certains auteurs restent prudents face à cette hypothèse (Barnes, 1995; Maren et Fanselow, 1996; Riedel et Reymann, 1996). D'autres remettent même complètement cette théorie en question (McEachern et Shaw, 1996; Shors et Matzel, 1997).

Plus récemment, la technologie génétique a permis d'explorer encore plus en profondeur la relation pouvant exister entre le phénomène de potentialisation à long terme et la mémoire spatiale. Par exemple, des souris génétiquement déficientes en protéine kinase II  $\alpha$ -Ca<sup>2+</sup>-calmoduline ( $\alpha$ -CaMKII) ne peuvent reproduire le phénomène de la LTP hippocampale après une stimulation électrique de haute fréquence. En parallèle, les auteurs rapportent également que ce type de souris présente des problèmes de mémoire qui sont principalement reliés à certaines tâches d'apprentissage spatial (Silva et al., 1992; Silva, Stevens, Tonegawa et Wang, 1992). Une conclusion similaire (Grant et al., 1992) a été tirée des analyses de souris déficientes du gène *fyn* codant pour la tyrosine kinase. Bach et ses collègues (1995) ont pour leur part démontré que des souris déficientes en CaMKII sont incapables d'accomplir une tâche spatiale bien que la LTP soit facilement reproduite chez ces mutantes. Une autre étude portant cette fois-ci sur des souris déficientes en isoforme  $\gamma$  de la protéine kinase C (PKC), révéla une

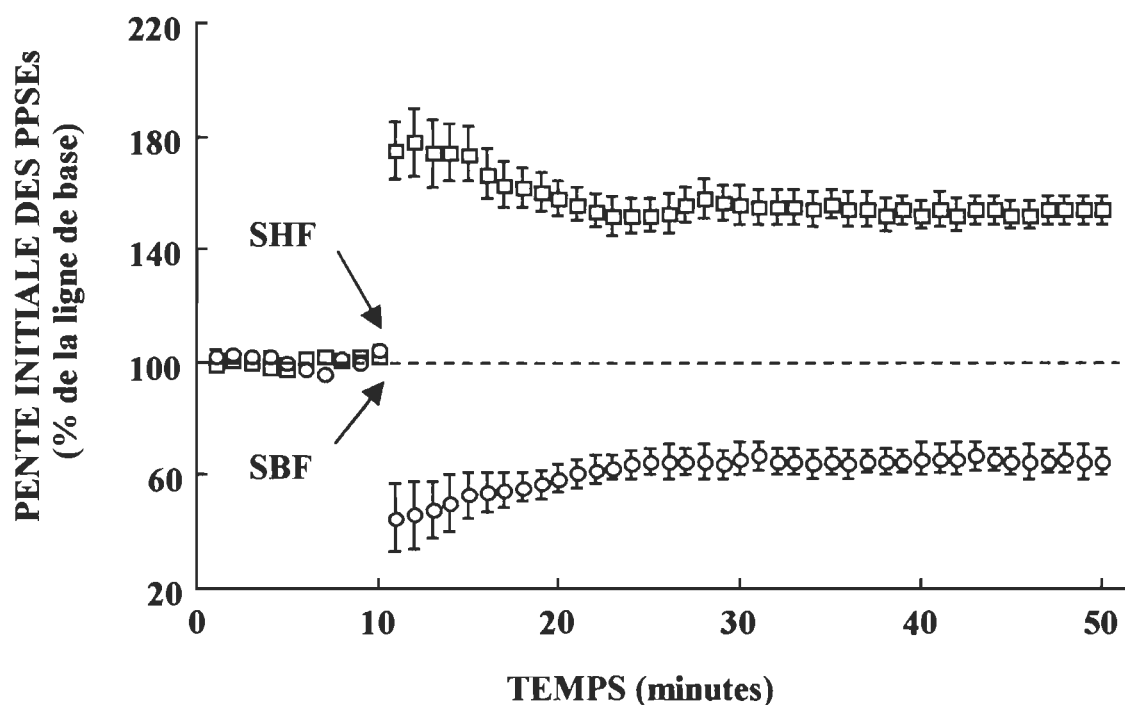
incapacité à produire la LTP alors que leur mémoire spatiale n'est que très peu touchée (Abeliovich, Chen, Goda, Silva et Tonegawa 1993; Abeliovich, Paylor, Chen, Kim, Wehner et Tonegawa, 1993). D'autres équipes ont rapporté une acquisition normale des tâches spatiales avec une absence de LTP (Huang et al., 1995; Nosten-Bertrand et al., 1996) tandis que d'autres ne démontrent aucune trace de mémorisation spatiale bien que le phénomène de potentialisation à long terme soit bel et bien présent (Motro, Wojtowicz, Bernstein et Van Der Kooy, 1996). Il faut cependant garder en tête que ces souris transgéniques sont nées avec des gènes défectueux et pourront possiblement voir leur développement altéré d'un point de vue anatomique (Huerta, Searce, Farris, Empson et Prusky, 1996), physiologique (Umemori, Sato, Yagi, Aizawa et Yamamoto, 1994) et/ou comportemental (Gerlai, 1996). Donc, toutes ces études faites sur des souris transgéniques ne peuvent pas, du moins pour l'instant, confirmer sans l'ombre d'un doute l'hypothèse voulant qu'il existe un lien entre le phénomène de potentialisation à long terme et l'apprentissage spatial. Bien que ces études effectuées chez des souris transgéniques aient été des plus intéressantes en regard de la compréhension des mécanismes moléculaires de la LTP, il faut comprendre qu'elles s'avèrent très complexes dans leur interprétation compte tenu des impacts peu spécifiques de la procédure de transgénèse. En d'autres mots, le manque de spécificité cellulaire souvent rencontré lors de la production d'animaux transgéniques rend difficile la découverte d'un lien étroit entre un système cellulaire spécifique et la présence d'un phénotype quel qu'il soit. Mentionnons que le développement récent de la technologie dite « conditional knockout » aidera grandement à contourner ce problème (Brusa, 1999).

L'idée que la LTP soit le processus par excellence de la mémorisation est de plus en plus contestée. En effet, il a été démontré que les animaux enrichis cognitivement lors de l'apprentissage de certaines tâches voient leur niveau de LTP réduit dans la région hippocampale. En fait, chez ces animaux, il a été démontré qu'une saturation du niveau de LTP dans l'hippocampe est en lien avec l'apprentissage. Il est convenu de reconnaître que la potentialisation synaptique ne puisse être qu'un processus général de facilitation neuronale indépendant de la trace mnésique. Il en demeure pas moins que son étude demeure d'un intérêt premier pour les neurobiologistes compte tenu de l'importance de la LTP comme mécanisme d'adaptation à long terme de la fonction des neurones.

## 1.2 – Aspects neuropharmacologiques de la LTP

C'est au niveau de l'hippocampe que furent présentée les premières évidences expérimentales appuyant le postulat de Hebb. Deux types de plasticité synaptique y prennent place: la *potentialisation à long terme* (LTP) et la *dépression à long terme* (LTD) (Bliss et Collingridge, 1993; Bear et Malenka, 1994). Ces deux phénomènes de plasticité sont induits par des fréquences de stimulation différentes. La figure 3 fait ressortir les différences entre les deux phénomènes. Une stimulation électrique de haute fréquence (100 Hz) augmenterait l'efficacité de la transmission synaptique, phénomène susceptible de permettre l'emmagasiner de l'information dans le système nerveux alors

qu'une stimulation électrique de basse fréquence (1 Hz) diminuerait la transmission synaptique, modèle susceptible de contribuer à la perte de mémoire.



*Figure 3.* Stimulations électriques des neurones de l'hippocampe. Potentialisation de la transmission synaptique suite à une stimulation de haute fréquence (SHF; carrés) et dépression de la transmission synaptique suite à une stimulation de basse fréquence (SBF; cercles).

Mais encore faut-il démontrer que ces mécanismes de plasticité synaptique existent et prennent place au niveau des synapses responsables de l'emmagasinage de l'information lors de l'apprentissage chez l'animal. À cet égard, des études réalisées sur des souris transgéniques démontrent une perte de l'apprentissage de certaines tâches

comportementales qui est bien corrélée avec le déficit hippocampique en LTP qui caractérise les souris mutantes (Grant, O'Dell, Karl, Stein, Soriano et Kandel, 1992; Silva, Paylor, Wehner et Wang, 1992). Nous y reviendrons à la section 1.2.4.

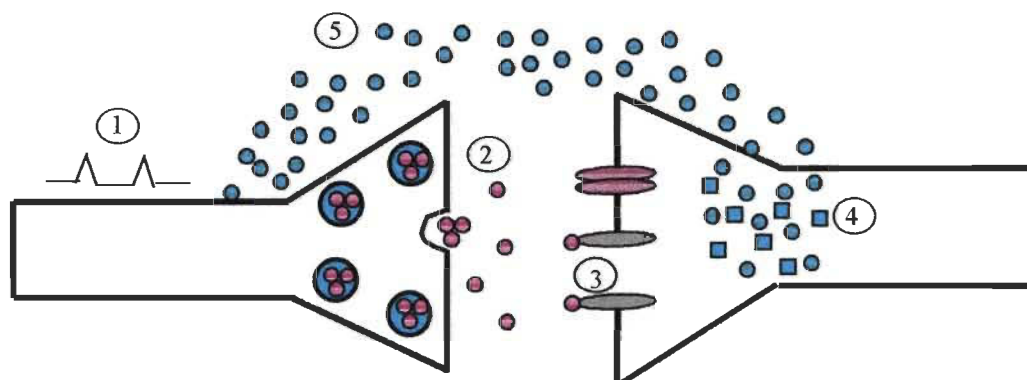
Fait intéressant, chez l'humain, les lésions hippocampales perturbent profondément les formes explicites de mémorisation, c'est-à-dire celles qui dépendent du registre conscient alors qu'elles épargnent les formes de mémorisation inconscientes ou implicites (Hirsh, 1974; O'Keefe et Nadel, 1978; Sutherland et Rudy, 1989; Squire, 1987, 1992; Eichenbaum, Cohen, Otto et Wible, 1991; Eichenbaum, Otto et Cohen, 1992). Jusqu'à présent, aucune équipe de recherche n'a réussi à reproduire des amnésies comparables chez l'animal. Cependant, il est possible, grâce à une tâche comportementale, d'évaluer chez le rat, la mémoire explicite. Cette tâche d'apprentissage appelée en anglais, *Morris water maze task*, exige de la part de l'animal de mémoriser l'emplacement d'une passerelle immergée dans l'eau et de nager jusqu'à celle-ci. Ce processus de mémorisation est appelé la *mémoire spatiale*. Jarrard et ses collègues (1993) rapportent que l'hippocampe serait fortement impliqué dans ce type de mémorisation. De plus, nombreux sont les arguments supportant le rôle de la LTP dans cette forme d'apprentissage (Morris, 1989, 1994; Bliss et al., 1993).



Avant d'aller plus loin, il importe d'aborder certaines notions de base à propos de la neurotransmission.

### 1.2.2 - Fonctionnement d'une synapse

La figure 4 explique la cascade de réactions assurant la neurotransmission. Lorsque des impulsions électriques (1) parcourent le neurone présynaptique et parviennent à l'extrémité de l'axone, le neurotransmetteur (2), qui est contenu dans des vésicules synaptiques, est libéré dans l'espace qui sépare les deux neurones. Il agit en se fixant sur des molécules réceptrices enchâssées dans la membrane du neurone postsynaptique (3). En plus de la transmission du message nerveux, c.-à-d. des modifications des propriétés électriques du neurone postsynaptique, cette action entraîne une série de changements biochimiques, mettant en œuvre une panoplie de molécules. Ces molécules, qui assurent la transmission du signal à l'intérieur de la cellule nerveuse, sont appelées seconds messagers. Leur action, organisée en cascades complexes, se répercute soit sur les molécules réceptrices (4), soit, par action en retour (rétrograde) sur le neurone présynaptique (5), sur la libération du neurotransmetteur.



*Figure 4.* Cascades de réactions assurant la neurotransmission.

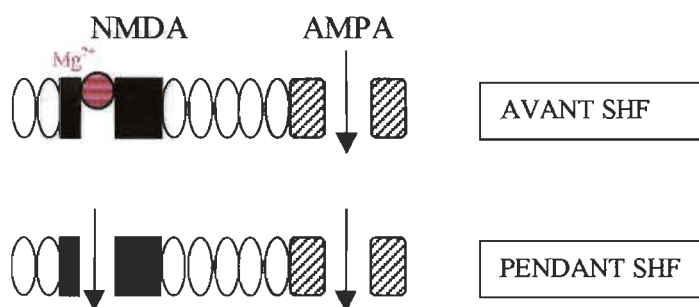
### 1.2.3 - Pharmacologie des récepteurs au glutamate

Dans l'hippocampe, une plasticité neuronale permanente doit être maintenue de manière à assurer les modifications physiologiques responsables de la mise en place des processus de mémorisation. Plusieurs études ont convergé pour démontrer l'importance du neurotransmetteur glutamate dans le développement des phénomènes de plasticité neuronale qui accompagnent les processus de mémorisation durant la vie adulte. Ironiquement, une activation excessive du système glutamatergique serait à la base de l'apparition des lésions cellulaires qui accompagnent, entre autres, l'épilepsie et les accidents cérébraux vasculaires.

Au moins trois types de récepteurs pour le glutamate ont été caractérisés. Ils sont généralement classés en deux grands groupes dont la distinction repose sur leur affinité pour l'analogue structural sélectif N-méthyl-D-aspartate (NMDA). On distingue ainsi les récepteurs du glutamate activés par le NMDA (récepteurs NMDA) et les récepteurs du glutamate insensibles au NMDA mais activés par le quisqualate ou le kainate (récepteurs non-NMDA). Pour leur part, les récepteurs quisqualate se subdivisent en deux sous-types de récepteurs: i) le quisqualate *métabotrope* couplé à une protéine G et ii) le quisqualate *ionotrope* sensible à l'action de l'acide  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionique (AMPA).

Par l'utilisation d'agonistes et d'antagonistes sélectifs des récepteurs NMDA et non-NMDA (tableau 1), il fut possible de mettre en évidence la participation de chacun de ceux-ci dans les réponses synaptiques générées par le glutamate endogène. La figure 5 démontre que c'est le récepteur quisqualate ionotrope ou plus simplement le récepteur AMPA qui est responsable de la production des potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSE) des neurones glutamatergiques et qui, par conséquent, assure la réponse glutamatergique rapide (Kauer, Malenka et Nicoll, 1988; Muller, Joly et Lynch, 1988; Davis, Lester, Reymann et Collingridge, 1989; Collingridge et Singer, 1990). Les récepteurs NMDA ont, pour leur part, la caractéristique principale d'être bloqués de manière voltage-dépendante par les ions magnésium ( $Mg^{2+}$ ) et n'interviennent donc pas normalement dans la transmission synaptique assurée par le glutamate. C'est seulement à

un certain niveau de dépolarisation de la membrane ( $V_m > -30$  mv) qu'ils peuvent être activés en présence de l'agoniste (Collingridge, Kehl et McLennan, 1983; Larson et Lynch, 1988; Collingridge et al., 1990).



*Figure 5.* Rôle des récepteurs NMDA dans la plasticité neuronale.

Tableau 1

**Principaux ligands utilisés pour l'étude des propriétés de liaison  
des récepteurs au glutamate**

Type	Agonistes	Antagonistes	Bloqueurs de canal
NMDA	Glu Asp Gly NMDA	AP5 CGP 61594 Ifenprodil Ethanol DynA(1-13) Nitrous oxide	MK-801 Phencyclidine Ketamine Dextrophan Memantine
AMPA	Glu Kainate ACPA (S)APPA 5-fluorowillardine Domoic acid $\beta$ -N-methylamino-L-alanine AMPA Quisqualate	ATPO LY300168	Argiotoxine Philanthotoxine
KAINATE	Glu AMPA Domoate SYM 2081 (S)-5-iodowillardiine Kainate	LY293558	Argiotoxine Philanthotoxine
MÉTAPOTROPE	Glu Quisqualate Ibotenate t-ACPD	MCPG DHPG Trans-ADA	

Glu :	Glutamate
Asp :	Aspartate
Gly :	Glycine
AMPA :	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate
ACPA :	(RS)-2-amino-3-(3-carboxy-5-méthyl-4-isoxazolyl) propionic acid
(S)APPA :	(S)-2-amino-3-(3-hydroxy-5-phenyl-4-isoxazolyl) propionic acid
SYM 2081 :	(2S-4R)-4-methylglutamate
t-ACPD :	( $\pm$ )-1-aminocyclopentane-trans-1,3-dicarboxylic acid
AP5 :	D-2-amino-5-phosphonopentanoate
CGP 61594 :	dichloro-tetrahydroquinoline-2-carboxylic acid
LY293558 :	Tetrazole-substituted decahydroisoquinoline
ATPO :	Phospho analog of AMPA
DynA(1-13) :	Dynorphin A (1-13)
MK-801 :	5-méthyl-10,11-dihydro-5H-dibenzocyclohepten-5,10-imine maleate
MCPG :	d-méthyl-4-carboxyphenylglycine
DHPG :	(S)-3,5-dihydroxyphenylglycine
Trans-ADA :	trans-azetidine-2,4-dicarboxylate

Donc en résumé, les réponses synaptiques obtenues dans la plupart des synapses présentant le phénomène de LTP sont assurées par l'interaction du glutamate avec deux types de récepteurs, le récepteur NMDA dont il a été question précédemment et un autre sous-type de récepteur au glutamate faisant partie du groupe des non-NMDA, soit le récepteur AMPA. La réponse synaptique habituellement observée suite à une stimulation électrique normale est due à l'activation des récepteurs AMPA, tandis que, comme discuté plus tôt, l'activation des récepteurs NMDA survient seulement lors d'événements spéciaux comme une stimulation électrique de haute fréquence.

Entrons maintenant dans notre modèle de plasticité neuronale. Il est traditionnellement établi que la LTP se divise en trois phases distinctes, soit: i) l'induction, ii) le développement et iii) l'expression et le maintien.

#### 1.2.4 - Induction de la LTP

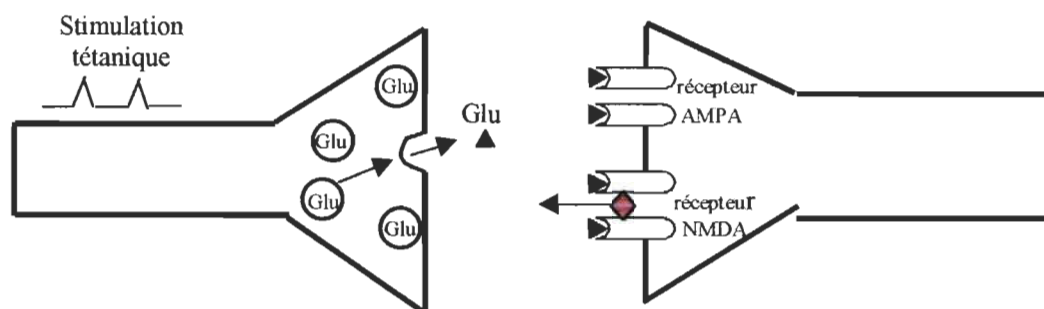
Pour induire la LTP cela exige, comme nous l'avons déjà mentionné, une stimulation électrique de haute fréquence dont les paramètres expérimentaux sont maintenant bien caractérisés; le patron de stimulation utilisé ressemble fortement au patron naturel de décharge des neurones de l'hippocampe qu'on observe lors d'une situation d'apprentissage (Larson, Wong et Lynch, 1986). Durant une session d'enregistrement

d'un électroencéphalogramme (EEG) chez l'animal engagé dans un comportement d'exploration (et donc d'apprentissage), le rythme proéminent du cerveau se situe entre 5 et 7 Hz, soit le rythme communément appelé *thêta*.

Dans le modèle expérimental de la LTP, Lynch et ses collègues (Larson et al., 1986) ont démontré que les conditions optimales de stimulation doivent contenir dix trains de haute fréquence de quatre pulsations à 100 Hz répétées à un intervalle de temps de 200 msec, soit une fréquence de 5 Hz. Cette condition expérimentale, les neuroscientifiques l'ont nommée *stimulation thêta* puisqu'elle ressemble grandement au rythme thêta ( $\theta$ ) de l'hippocampe. Depuis, plusieurs autres laboratoires ont obtenu des résultats similaires, et ces paramètres de stimulation sont maintenant largement utilisés pour induire le phénomène de LTP (Diammond, Dunwiddie et Rose, 1988; Greenstein, Pavlides et Winson, 1988). Par ailleurs, il est reconnu que l'induction de la LTP par une stimulation thêta est particulièrement favorisée dans la région CA<sub>1</sub> de l'hippocampe. Dans cette région, la LTP est effectivement en lien avec l'activation des récepteurs NMDA lesquels sont particulièrement sensibles à ces fréquences. Il ne faut toutefois pas élargir ces mécanismes à l'ensemble des régions du cerveau. En effet plusieurs formes de LTP peuvent être reproduites dans les diverses régions de l'hippocampe par des fréquences de stimulation qui n'ont rien à voir avec le rythme thêta et l'activation des récepteurs NMDA.

Différentes études ont démontré que c'est spécifiquement l'activation des récepteurs NMDA qui constitue l'étape cruciale de l'induction de la LTP (Collingridge et al., 1983; Nowack, Bregestovski, Ascher, Herbert et Prochiantz, 1984; Mayer, Westbrook et Guthrie, 1984). Sachant que l'activation des récepteurs NMDA nécessite la présence concomitante de deux facteurs, une dépolarisation préalable de la membrane (afin d'éliminer le blocage par les ions  $Mg^{2+}$ ) et la présence de l'agoniste, les neurobiologistes ont proposé la théorie suivante illustrée à la figure 7: la stimulation tétanique appliquée pendant un court laps de temps (1 sec.) entraîne une libération accrue de glutamate, lequel en se fixant sur de nombreux récepteurs AMPA, dépolarise la membrane postsynaptique. Cette dépolarisation libère quelques récepteurs NMDA de leur blocage par le  $Mg^{2+}$  (losange rouge) et permet ainsi leur activation par le glutamate présent dans la fente synaptique. L'activation de ces quelques récepteurs NMDA favorise elle-même une dépolarisation accrue de la membrane postsynaptique et permet ainsi l'activation de récepteurs NMDA additionnels. Ce phénomène en cascade assurerait donc l'induction de la LTP. Il est donc clair que dans la région CA<sub>1</sub> de l'hippocampe, l'activation des récepteurs NMDA par des fréquences de type thêta constitue l'un des moyens les plus efficaces pour engendrer la LTP. Il ne faut toutefois pas présumer que tous les récepteurs NMDA du cerveau sont sensibles à ces fréquences. Par exemple, on sait que les récepteurs NMDA du cortex visuel sont difficilement activables à ces fréquences dans des conditions où la fonction GABAergique est présente. En effet, la LTP dans le cortex visuel peut uniquement être produite lorsque des inhibiteurs du système GABAergique sont introduits à la préparation.





*Figure 6.* Mécanisme d'induction de la LTP.

Lynch et son équipe ont depuis confirmé cette hypothèse en démontrant d'une part, que les récepteurs NMDA participent effectivement à la dépolarisation membranaire générée par la stimulation thêta (Larson et al., 1988) et d'autre part, que l'activation de ces mêmes récepteurs apparaît être la condition nécessaire et suffisante à l'induction de la LTP (Muller et al., 1988).

Dans un même ordre d'idée, Sakimura et son équipe (Sakimura et al., 1995) ont étudié l'effet d'une mutation sur des gènes codants pour une sous-unité du récepteur NMDA chez la souris, afin de démontrer le rôle de ce dernier dans la LTP et sa relation avec l'apprentissage et la mémoire spatiale. Encore là, l'étude révèle des difficultés

d'apprentissage spatial, consolidant par le fait même le lien établi entre la LTP et la mémoire.

Bien que les mécanismes moléculaires sous-jacents aux phénomènes de plasticité synaptique ne soient pas bien compris, il apparaît qu'un influx de calcium dans la structure postsynaptique serait nécessaire à leur induction (Lynch, Larson, Kelso, Barrionuevo et Schottler, 1983; Malenka, Lancaster et Zucker, 1992; Mulkey et Malenka, 1992; Artola et Singer, 1993). Le lien pouvant alors exister entre l'activation des récepteurs NMDA et le rôle critique d'une augmentation intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  a été établi lorsqu'on a découvert que le canal ionique du récepteur NMDA était lui-même perméable aux ions calciques (McDermott, Mayer, Westbrook, Smith et Barker, 1986). En fait, la quantité de calcium entrant dans la structure postsynaptique dépendrait de la fréquence de stimulation utilisée.

Il existe également selon d'autres études, quelques évidences circonstanciées qui laissent croire que le récepteur métabotrope pour le glutamate peut aussi être impliqué dans la phase d'induction de la LTP hippocampique (McGuinness, Anwyl et Rowan, 1991; Zheng et Gallagher, 1992; Bashir, Tam et collingridge, 1993; Bortolotto et Collingridge, 1993; Manahan-Vaughan et Reymann, 1996). Ce récepteur pourrait être responsable de maintenir une concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  élevée pendant une

période relativement longue (plusieurs minutes). Jusqu'à maintenant, huit sous-types de récepteurs métabotropes ont été identifiés (mGluR1-8) (Nakanishi et Masu, 1994; Conn et Pin, 1997). De façon générale, l'activation d'un récepteur couplé à cette voie conduit à l'hydrolyse des phosphatidylinositols et à la formation d'IP<sub>3</sub> dans le cytoplasme qui, en retour, produit une libération intracellulaire des ions Ca<sup>2+</sup> endogènes stockés dans le réticulum endoplasmique. En parallèle avec l'induction de la LTP, une augmentation de l'activité des sous-types 1 et 5 du récepteur quisqualate métabotrope a été observée (Breakwell, Rowan, Anwyl, 1998). On croit de plus, que le récepteur quisqualate métabotrope contribuerait aux mécanismes impliqués dans la dernière phase de la LTP, soit le maintien du phénomène (Aronica et al., 1991) (voir section 1.2.6).

Quoiqu'il en soit, il est admis qu'une augmentation de calcium intracellulaire dans le neurone postsynaptique s'avère une étape essentielle à l'induction de la LTP et pour l'instant, tout porte à croire qu'autant le récepteur NMDA que le récepteur métabotrope peuvent y contribuer (Malenka, Kauer, Zucker et Nicoll, 1988; Lynch, Larson, Kelso, Barrionuevo et Schottler, 1983; Xie, Berger et Barrionuevo, 1992).

### 1.2.5 - Développement de la LTP

Puisque le calcium est bien connu pour son rôle de messager intracellulaire et qu'il reste en concentration élevée dans la structure postsynaptique pendant un certain temps suivant la stimulation tétanique, il est généralement admis que durant cette période, divers processus enzymatiques dépendants du calcium peuvent être activés. Plusieurs indices concernant la durée de cette période ont été fournis jusqu'à maintenant par des études réalisées sur le cours temporel du développement de la LTP. Une des principales difficultés à déterminer la période de temps correspondant au développement de la LTP est que le train de haute fréquence utilisé pour induire le phénomène produit plusieurs formes de potentialisation, en particulier une potentialisation post-tétanique (PPT) de quelques secondes qui semble être reliée à un effet présynaptique et une potentialisation à court terme (PCT) de quelques minutes qui est probablement associée à une modification postsynaptique déclenchée par l'activation des récepteurs NMDA. Néanmoins, plusieurs équipes ont tenté de déterminer le temps requis au développement de la LTP (McNaughton, 1982; Arai, Larson et Lynch, 1990; Gustafsson et Wigstrom, 1990). La principale conclusion tirée de ces diverses études est que la LTP prendrait moins de une à deux minutes pour se développer.

### 1.2.6 - Expression et maintien de la LTP

Cette dernière partie de la LTP, qui permet au phénomène de demeurer pendant des heures sinon des jours, semble résulter d'une augmentation durable de la réponse synaptique assurée par la composante du récepteur AMPA, sans toutefois altérer ou modifier la composante du récepteur NMDA (Kauer et al., 1988; Muller et al., 1988). Cette découverte a été récemment controversée (Bashir et Collingridge, 1990). En fait, si l'explication fournie précédemment concernant l'induction et le développement de la LTP est généralement admise, les événements consécutifs à l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'élément postsynaptique, qui permettent d'exprimer et de maintenir la LTP pendant un certain temps, sont encore très discutés.

En principe, trois mécanismes différents pourraient contribuer à accroître l'efficacité synaptique: i) une augmentation de la relâche du neurotransmetteur, ii) un changement des propriétés du récepteur AMPA et iii) une modification des caractéristiques biophysiques des épines dendritiques. En outre, aucune étude n'a jusqu'à maintenant exclue l'une ou l'autre de ces possibilités et il est même permis d'imaginer l'existence de n'importe quelles combinaisons de celles-ci dans le processus participant à l'expression et au maintien de la LTP. Par contre, chacun des mécanismes mentionnés permet d'établir certaines prédictions.

Une hausse de relâche de glutamate devrait nécessiter la présence d'un signal rétrograde venant du neurone postsynaptique pour agir sur la terminaison présynaptique et ainsi produire une libération accrue et spécifique du neurotransmetteur par les neurones ayant expérimenté une période de stimulation tétanique. Or, le phénomène de la *facilitation pairée*, est un processus dont le mécanisme s'appuie sur une libération accrue de neurotransmetteurs. C'est-à-dire que toutes manipulations menant à une modification de la relâche de neurotransmetteurs affectent grandement le degré de facilitation pairée (Staubli, Larson et Lynch, 1990; Zalutsky et Nicoll, 1990). Ainsi donc, si une libération accrue de neurotransmetteurs par la structure présynaptique est le mécanisme sous-jacent au maintien de la LTP, on devrait s'attendre à ce que le développement de ce phénomène interfère avec le niveau de facilitation pairée. Dans l'hippocampe, aucune modification du degré de facilitation pairée n'a toutefois été observée suite à l'apparition de la LTP (Muller et Lynch, 1989; Muller, Buchs, Dunant et Lynch, 1990), suggérant fortement que l'hypothèse d'une composante présynaptique ne représente pas une étape cruciale du maintien de la potentialisation. Il ne faut cependant pas rejeter du revers de la main l'hypothèse présynaptique sur la seule base des expériences de facilitation pairée. En effet plusieurs études électrophysiologiques tentent à supporter la contribution d'un mécanisme présynaptique dans la LTP et nombreux sont les neurobiologistes à supporter cette hypothèse.

Le maintien du phénomène de potentialisation à long terme pourrait par ailleurs, résulter d'une transformation biophysique des épines dendritiques. En effet, une étude basée sur des stimulations par ordinateur a évalué cette hypothèse. D'après le modèle d'étude, une augmentation de l'encolure de l'épine et donc une diminution de la résistance de celle-ci, produirait un effet différentiel entre les récepteurs AMPA et NMDA. Cet effet se traduirait par une augmentation plus importante de la réponse de la composante AMPA (Wilson, 1988). Bien que cette modélisation soit très intéressante, des recherches subséquentes n'ont pu appuyer expérimentalement cette hypothèse (Jung, Larson et Lynch, 1991). Donc, pour l'instant, l'idée d'un changement des propriétés du récepteur AMPA est la cause la plus probable de l'expression et du maintien de la LTP.

Dans cette section, nous avons mis l'accent sur le phénomène de potentialisation à long terme induit par l'activation des récepteurs NMDA. Cependant, la potentialisation des synapses dans l'hippocampe peut être divisée en deux formes dont la distinction repose sur la capacité des antagonistes du récepteur NMDA d'empêcher l'induction de la LTP. On distingue ainsi une LTP dépendante du récepteur NMDA et une LTP indépendante du récepteur NMDA. Dans la première catégorie, au moins deux types de facilitation ont été identifiés: une potentialisation à court terme (PCT) dont la durée est approximativement de 30 minutes et une potentialisation à long terme qui est maintenue plusieurs heures. Ces formes de facilitation synaptique que l'on retrouve dans plusieurs synapses du cerveau, sont induites par une augmentation de calcium dans le neurone

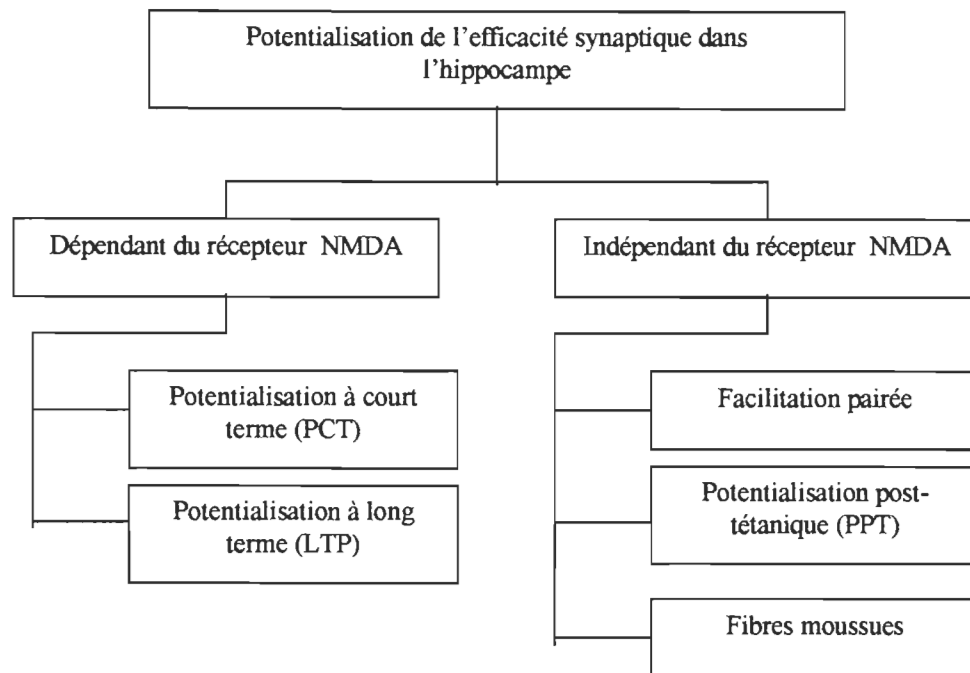
postsynaptique. De plus, il semble que l'expression de ces formes résulte de mécanismes postsynaptiques comme la régulation des récepteurs AMPA.

La deuxième forme de facilitation synaptique, indépendante du récepteur NMDA, inclut la facilitation pairée dont le mécanisme repose sur une libération accrue de neurotransmetteurs et la potentialisation post-tétanique (PPT) de quelques secondes qui semble être reliée à un effet présynaptique. Ces formes de facilitation sont observées dans les fibres moussues, issues des axones des cellules granulaires qui projettent vers les cellules pyramidales de la région CA<sub>3</sub> de l'hippocampe. Il semble que les neurones postsynaptiques ne jouent aucun rôle autant dans l'induction que dans l'expression de cette forme de potentialisation. Cependant, l'entrée de calcium serait conditionnelle mais au niveau de la terminaison présynaptique seulement. Le tableau 2 résume les différentes formes de facilitation synaptique.



Tableau 2

Classification des formes de facilitation synaptique dans l'hippocampe



### 1.3 - La régulation des récepteurs AMPA

#### 1.3.1 - Rôle des protéines de fusion membranaire

Une récente hypothèse sur la régulation du récepteur AMPA dans le maintien de la LTP met en cause l'insertion rapide de nouveaux récepteurs AMPA dans les synapses (Edwards, 1991; Kullmann et Nicoll, 1992; Liao, Jones et Malinow, 1992; Lisman et Harris, 1993; Manabe, Wyllie, Perkel et Nicoll, 1993). Les mécanismes moléculaires par

lesquels les récepteurs sont envoyés à leur site d'action et la régulation de l'insertion membranaire, de l'encrage et de la réinternalisation ne sont pas bien compris.

Il a récemment été démontré que le phénomène de potentialisation à long terme est bloqué par le N-ethylmaleimide (NEM), un inhibiteur de la protéine de fusion membranaire N-ethylmaleimide-sensible (NSF) (Lledo, Zhang, Südhof, Malenka et Nicoll, 1998). Certaines études se sont donc orientées vers la compréhension du mécanisme d'action de cette ATPase multihomomérique (Hanson, Roth, Morisaki, Jahn et Heuser, 1997) qui est reconnue pour jouer un rôle central dans les mécanismes de fusion des vésicules de neurotransmetteurs (Schweiser, Dresbach, DeBello, O'Connor, Augustine et Betz, 1998) et de relâche (Söllner et Rothman, 1994).

Un fait intéressant est le haut degré d'expression de la NSF dans le système nerveux, plus spécifiquement dans l'hippocampe (Hong et al., 1994; Püschel, O'Connor et Betz, 1994). Il a été démontré que la NSF interagit directement avec le récepteur AMPA (Osten et al., 1998; Nishimune et al., 1998). Le rôle exact de cette interaction reste à préciser mais serait selon toute vraisemblance impliqué dans la redistribution subcellulaire des récepteurs glutamatergiques de type AMPA (Song et al., 1998). On peut donc envisager une interaction possible entre la NSF et le récepteur AMPA. Mais tout d'abord il importe de connaître l'arrangement structural du récepteur.

Les récepteurs AMPA sont constitués d'un assemblage de sous-unités, GluR1 à GluR4, codées par des gènes différents, lesquels sont exprimés différemment à travers le SNC (Boulter et al., 1990; Hollmann et Heinemann, 1994; Bettler et Mülle, 1995). Chacune des sous-unité est une protéine transmembranaire avec une extrémité extracellulaire N, 4 domaines membranaires et une extrémité C-terminale intracellulaire (Hollmann et al., 1994). Selon la composition du récepteur en sous-unités, ce dernier aura différentes caractéristiques fonctionnelles (Jonas, Racca, Sakmann, Seeburg et Monyer, 1994; Raman, Zhang et Trussell, 1994). On a par exemple identifié des récepteurs AMPA perméables et imperméables aux ions calcium. Pour former un canal imperméable au calcium, au moins une sous-unité GluR2 doit être présente dans le complexe du récepteur AMPA alors qu'une absence de GluR2 rend le canal associé au récepteur perméable aux ions calcium (Jonas et Burnashev, 1995; Seeburg, 1996).

Récemment, on a démontré que l'extrémité C-terminale du récepteur AMPA interagit avec une zone spécialisée du cytosquelette située à la jonction synaptique appelée PSD (de l'anglais *post-synaptic density*) (Dong, O'Brien, Fung, Lanahan, Worley et Huganir, 1997). Ces interactions semblent moduler l'ancrage du récepteur AMPA ainsi que le transport d'autres protéines régulatrices à proximité du récepteur. De plus, il semble y avoir un lien entre les phénomènes de plasticité synaptique et la PSD. Par exemple, une composante majeure de la PSD, la sous-unité alpha de la PKII calcium/calmoduline (Kennedy, Bennett et Erondou, 1983; Goldenring, McGuire et

DeLorenzo, 1984; Kelly, McGuinness et Greengard, 1984), joue un rôle central dans la LTP (Miller et Kennedy, 1986; Lisman et Goldring, 1988). Fait intéressant, des études de fractionnements biochimiques ont démontré que la protéine de fusion NSF se retrouve en concentration élevée dans la région PSD (Walsh et Kuruc, 1992).

Bien que la NSF se lie à une variété de protéines différentes, elle interagit fortement avec GluR2, faiblement avec GluR3 et pas du tout avec GluR1 et GluR4 (Nishimune et al., 1998). Donc, la NSF interagit directement et spécifiquement avec la sous-unité GluR2 du récepteur AMPA dans le but d'internaliser ces derniers où ils subiront des modifications fonctionnelles avant d'être réinsérés dans la membrane postsynaptique. Un mouvement rapide des récepteurs AMPA sous le contrôle de la NSF vers et depuis la membrane pourrait avoir des implications importantes dans la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents à la plasticité synaptique. Si l'action de la NSF est empêchée, les récepteurs internalisés ne pourront être modifiés correctement avant leur réinsertion dans la membrane postsynaptique. Inversement, le blocage de l'interaction NSF-GluR2 produit une réduction rapide du courant ionique généré par le canal du récepteur AMPA (Nishimune et al., 1998). Cette diminution d'amplitude pourrait être le résultat de l'absence d'insertion du récepteur AMPA dans la membrane postsynaptique due à une rupture du lien NSF-GluR2. Donc tout porte à croire qu'une interaction directe entre la sous-unité GluR2 du récepteur AMPA et la protéine de fusion membranaire NSF dans les cellules postsynaptiques serait impliquée dans la régulation de

la transmission synaptique glutamatergique. On peut même avancer l'hypothèse que l'inhibition de la transmission synaptique dans le mécanisme de dépression à long terme pourrait être la cause d'une brisure de l'interaction GluR2-NSF.

Outre la NSF, d'autres protéines pourraient interagir avec le récepteur AMPA. La protéine GRIP a été proposée comme étant une protéine adaptatrice qui pourrait être impliquée dans le regroupement des récepteurs AMPA (Dong et al., 1997). La protéine SNAP pourrait également former un complexe protéique avec le récepteur AMPA via la sous-unité GluR2 (Osten, et al., 1998). Mais contrairement à la NSF, l'impact de ces interactions avec le récepteur AMPA du point de vue fonctionnel reste à préciser. Des études subséquentes restent à être effectuées afin de déterminer le rôle de ces protéines dans la régulation du récepteur AMPA lors de la LTP.

Nous avons discuté auparavant de l'importance que joue l'ion calcium dans le déclenchement de la LTP. Or, plusieurs systèmes enzymatiques dépendants du calcium semblent contribuer à l'expression de la LTP. Parmi ces enzymes on compte les protéases et les phospholipases susceptibles de modifier à long terme la structure et la fonction des récepteurs glutamatergiques de type AMPA. Outre les protéases et les phospholipases, il semble qu'une troisième classe d'enzymes, les kinases, soit impliquée dans la LTP. Nous passerons ici en revue l'implication potentielle de ces enzymes dans la plasticité neuronale.

### 1.3.2 - Rôle des kinases

Les protéines kinases sont des enzymes qui catalysent la phosphorylation de diverses protéines. La phosphorylation de substrats spécifiques par une variété de protéines kinases est un mécanisme général par lequel beaucoup d'hormones, de neurotransmetteurs et autres agents extracellulaires produisent leurs réponses physiologiques sur des cellules réceptrices. En effet, des changements au niveau de la phosphorylation d'une variété de protéines ont été observés suivant une stimulation électrique de haute fréquence et il a même été suggéré qu'une activité des protéines kinases soit requise pour former la LTP (Bar, Schotmann, Gipsen, Tielen, Lopes et Silva, 1980; Akers, Lovinger, Colley, Linden et Routtenberg, 1985; Malenka et al., 1989). De plus, des études ont montré que des inhibiteurs de kinases (polymyxine B, composé H-7) interfèrent avec la formation de la LTP (Lovinger, Wong, Murakami et Routtenberg, 1987; Reymann, Frey, Jork et Matthies, 1988; Malenka et al., 1989). Par ailleurs, puisque les esters de phorbols sont connus pour activer directement la PKC et qu'ils produisent une augmentation à long terme de la transmission synaptique, on a proposé que l'activation de la protéine kinase C soit une étape importante dans l'expression de la LTP (Akers et al., 1985; Malenka, Madison et Nicoll, 1986; Malinow, Madison et Tsien, 1988). Toutefois, des données ont contredit cette hypothèse en indiquant clairement que la potentialisation occasionnée par les esters de phorbols était très différente de celle observée dans la LTP induite par une stimulation de haute fréquence; elle serait uniquement de nature présynaptique (Gustafsson et al., 1988). Le rôle de la PKC dans la

LTP reste donc actuellement très controversé. D'un autre côté, comme nous en avons discuté auparavant, la protéine kinase II calcium/calmoduline-dépendante apparaît également être susceptible de participer à la LTP. Des études biochimiques ont démontré que cette kinase subissait une autophosphorylation capable d'engendrer des changements quasi-perpétuels de son activité enzymatique (Miller et al., 1986; Lisman et al., 1988). Il a été suggéré que la capacité de la CaMKII à entretenir elle-même sa propre autophosphorylation puisse servir de mécanisme au maintien à long terme des changements de l'efficacité synaptique (Friedrich, 1990). La CaMKII est un constituant protéique majeur des structures postsynaptiques et serait par le fait même localisée idéalement pour modifier les propriétés et les fonctions des récepteurs AMPA. Les expériences qui ont démontré que l'injection intracellulaire de CaMKII bloque la formation de la LTP (Malenka et al., 1989) et que la sensibilité des récepteurs AMPA peut être affectée par l'action de certaines protéines kinases (Greengard, Pen, Nairn et Stevens, 1991; Wang, Salter et MacDonald, 1991), sont en accord avec cette idée.

Plus récemment, des travaux réalisés sur des souris transgéniques déficientes en protéine kinase II  $\alpha$ -Ca<sup>2+</sup>-calmoduline-dépendante ont révélé une perte de la capacité chez ces dernières à produire une potentialisation à long terme (Silva et al., 1992). Bien que les mutantes continuent de se comporter normalement, qu'elles ne présentent aucun défaut neuroanatomique majeur et que les mécanismes postsynaptiques, incluant les fonctions du récepteur NMDA, semblent normaux, la plupart de ces souris ne peuvent

développer le phénomène de la LTP après une stimulation électrique de haute fréquence. Ces études soulignent donc l'importance des kinases dans le phénomène de la potentialisation à long terme. Toutefois, il est intéressant de mentionner que la LTP n'est pas complètement abolie chez des souris déficientes en protéine kinase II  $\alpha$ -Ca<sup>2+</sup>-calmoduline-dépendante suggérant ainsi l'implication de systèmes enzymatiques additionnels dans la plasticité synaptique.

### 1.3.3 - Rôle des protéases

Un autre processus qui semble jouer un rôle important dans la régulation des récepteurs AMPA est la protéolyse via une enzyme dépendante du calcium, la calpaine (Lynch et Baudry, 1984). On a démontré que cette enzyme et un de ses substrats, la spectrine, sont présents dans la structure synaptique (Carlin, Bartelt et Siekevitz, 1983; Perlmutter, Siman, Gall, Seubert, Baudry et Lynch, 1988). Une série d'études réalisées par Baudry et son équipe rapporte que la calpaine augmente le nombre apparent de récepteurs au glutamate dans une préparation membranaire synaptique d'hippocampe chez le rat (Baudry, Arst et Lynch, 1981; Siman, Baudry et Lynch, 1985). Des expériences subséquentes admettent également un rôle des protéases dans le phénomène de potentialisation à long terme ainsi que dans les processus d'apprentissage et de mémorisation (Staubli, Baudry et Lynch, 1984; Staubli, Baudry et Lynch, 1985). Plus spécifiquement, lors d'une stimulation de haute fréquence, l'influx de calcium entrant



dans la structure postsynaptique via le récepteur NMDA, activerait la calpaine qui à son tour couperait les protéines du cytosquelette. Cette action aurait pour conséquence de modifier la structure membranaire et par le fait même la fonction du récepteur AMPA (Tocco, Massicotte, Standley, Thompson et Baudry, 1992; Bi, Tocco et Baudry, 1994). D'autre part, l'utilisation d'inhibiteurs de la calpaine (leupeptine, inhibiteur 1 de la calpaine) dans le milieu physiologique prévient la formation d'une LTP stable (del Cerro, Larson, Oliver et Lynch, 1990; Denny, Polan-Curtain, Ghuman, Wayner et Armstrong, 1990). De plus, l'activation des récepteurs NMDA semble générer une activation rapide *in situ* de la calpaine puisqu'on a remarqué, dans ces circonstances, une accumulation de certains produits de dégradation de la spectrine qui sont identiques à ceux générés par la calpaine (Seubert, Larson, Oliver, Jung, Baudry et Lynch, 1988; del Cerro et al., 1994; Vanderklish, Saido, Gall et Lynch, 1995). De plus, il n'y a aucune accumulation de débris de spectrine en présence de l'antagoniste du récepteur NMDA, l'APV, appuyant ainsi l'hypothèse voulant que la dégradation de la spectrine soit dépendante de l'activation des récepteurs NMDA.

De récentes études utilisant des anticorps contre les portions C- et N-terminale d'une sous-unité du récepteur AMPA, ont révélé que l'activation de la calpaine induit une protéolyse de la sous-unité GluR1 du récepteur. C'est ainsi qu'est formée une nouvelle sous-unité du récepteur AMPA de poids moléculaire plus petit (Bi, Chang, Molnar, McIlhinney et Baudry, 1996; Bi, Chen, Dang, Wenthold, Tocco et Baudry, 1997). De

plus, on a démontré sur des cultures de tranches d'hippocampe, qu'un traitement au NMDA produit plusieurs modifications des récepteurs AMPA, modifications résultant possiblement de l'activation de la calpaine (Gellerman, Bi et Baudry, 1997).

L'ensemble de ces données laisse entrevoir une contribution potentielle de la calpaine dans la régulation des récepteurs AMPA notamment au cours de la LTP. Malheureusement, aucun modèle transgénique en lien avec l'expression de la calpaine n'est disponible et notre compréhension du rôle de cette enzyme dans la LTP demeure que superficielle.

#### 1.3.4 - Rôle des phospholipases

Plus récemment, les recherches se sont orientées sur le rôle des phospholipases dépendantes du calcium dans la régulation des récepteurs AMPA et dans l'expression du phénomène de la LTP. En effet, bon nombre d'études supportent l'idée d'une participation des phospholipases  $A_2$  ( $PLA_2$ ) dans les mécanismes moléculaires impliqués dans l'apparition de récepteurs AMPA fonctionnels lors du phénomène de potentialisation à long terme (Baudry et Massicotte, 1992).

Il est reconnu que l'activation de ces enzymes permet le clivage des phospholipides et génère un nombre appréciable de métabolites qui peuvent, à leur tour, agir comme seconds messagers autant à l'intérieur qu'à l'extérieur de la cellule. Une autre conséquence notable de l'activation des phospholipases est la réorganisation de la composition et de la distribution des lipides dans la portion membranaire adjacente à ces enzymes (Loh et Law, 1988). En fait, il a même été rapporté qu'un traitement des membranes cellulaires aux phospholipases provoque une modification des caractéristiques de liaison de certains récepteurs. De plus, l'activation des récepteurs NMDA stimule la PLA<sub>2</sub> (Dumuis, Sebben, Haynes, Pin et Bockaert, 1988; Kim, Rordorf, Nemenoff, Koroshetz et Bonventre, 1995).

À la lumière de ces observations, Massicotte et Baudry ont étudié l'effet de deux phospholipases dépendantes du calcium, soit la phospholipase C et la phospholipase A<sub>2</sub>, sur les caractéristiques de liaison des différents sous-types de récepteurs au glutamate. Ils ont noté qu'un traitement exogène à la PLC et à la PLA<sub>2</sub> d'une préparation membranaire synaptique occasionne une hausse marquée de l'affinité d'un radioligand (<sup>3</sup>H-AMPA) au récepteur AMPA sans toutefois entraîner aucune modification des propriétés de liaison des agonistes pour le récepteur NMDA (Massicotte et Baudry, 1990; Massicotte, Kessler, Lynch et Baudry, 1990; Massicotte, Vanderklish, Lynch et Baudry, 1991). De plus, il semble que l'effet produit sur le récepteur AMPA soit le résultat d'une réorganisation de l'environnement lipidique autour de ce dernier, une idée fortement soutenue par des

expériences qui ont montré que certains phospholipides exogènes, particulièrement la phosphatidylsérine (PS), pouvaient être incorporés à la membrane et causer une augmentation de l'affinité du  $^3\text{H}$ -AMPA pour le récepteur AMPA (Baudry, Massicotte et Hauge, 1991; Tocco et al., 1992). De plus, des inhibiteurs de  $\text{PLA}_2$  bloquent la formation de la LTP (Williams et Bliss, 1988; Williams et Bliss, 1989; Massicotte et al., 1990).

Les mécanismes biophysiques assurant cette modulation du récepteur AMPA par la  $\text{PLA}_2$  restent à être élucidés. Nous savons toutefois, à partir d'expériences effectuées sur des plaquettes sanguines (Zwall et al., 1989), que la  $\text{PLA}_2$  engendre lorsque activée une perturbation de l'environnement lipidique des membranes. En particulier, il apparaît que l'activation de cette enzyme, perturbe momentanément l'asymétrie lipidique des membranes normalement présente dans les cellules au repos. Plus particulièrement, la  $\text{PLA}_2$  apparaît être en mesure de favoriser ce que l'on appelle le flip flop de la phosphatidylsérine (PS) de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur de cette dernière (Gagné et al., 1996). Dans le cas qui nous intéresse, il est intéressant de mentionner que les récepteurs AMPA sont facilement modulables par l'incorporation dans les membranes neuronales de la PS. En effet, seul ce phospholipide semble capable de reproduire les effets de la  $\text{PLA}_2$  sur l'affinité du récepteur AMPA, un résultat qui laisse fortement à penser que le flip flop de la PS puisse être un mécanisme biophysique assurant la régulation des récepteurs de type AMPA. Cette possibilité est d'autant plus intéressante compte tenu des observations que la PS favorise le maintien de la LTP hippocampique

(Borghese, Gomez et Ramirez, 1993). Soulignons par ailleurs qu'un tel mécanisme de régulation des récepteurs par l'environnement lipidique n'est pas unique au récepteur AMPA puisqu'il a été rapporté pour d'autres types de récepteurs en particulier pour ceux de l'acide gamma-amino-butyrique (GABA) (Pritchett et al., 1989).

D'autres études appuient un rôle critique pour la PLA<sub>2</sub> dans la LTP. Ces expériences indiquent que la hausse de liaison au récepteur AMPA après traitement à la PLA<sub>2</sub> se fait en parallèle à l'apparition de la LTP hippocampale chez les nouveau-nés (Baudry et al., 1991; Massicotte et al., 1992). D'autre part, comme mentionné auparavant, certains patrons de stimulation électrique peuvent produire une dépression à long terme de la transmission synaptique des coupes d'hippocampe chez les nouveau-nés, phénomène particulièrement plus difficile à obtenir chez les rats adultes (Dudek et Bear, 1993). Baudry et ses collègues (1991) ont suggéré la participation des phospholipases membranaires comme processus responsable de ce phénomène de dépression à long terme. Ici aussi, les inhibiteurs de PLA<sub>2</sub> produisent une diminution du niveau de dépression à long terme (Fitzpatrick et Baudry, 1994; Normandin et al., 1996).

Il est important de retenir que les inhibiteurs de PLA<sub>2</sub> réduisent le niveau des deux phénomènes de plasticité synaptique (LTP et LTD). Ceux-ci semblent donc partager une même cascade biochimique. Suite à une activation des récepteurs NMDA,

la PLA<sub>2</sub> serait activée par une entrée de calcium dans la structure postsynaptique, entraînant une modification de la transmission synaptique par les récepteurs AMPA et par le fait même, une modification de l'affinité du récepteur pour l'agoniste.

Bien que l'ensemble de ces études convergent pour suggérer une implication des phospholipases A<sub>2</sub> dans la régulation des récepteurs AMPA, peu d'informations sont actuellement disponibles concernant l'interaction de ce système enzymatique avec les autres enzymes impliquées dans la LTP, notamment les protéases et les kinases. Nous présenterons dans le cadre de cette thèse des informations démontrant un certain degré d'interaction entre la protéine kinase C et la PLA<sub>2</sub> du moins en ce qui a trait à la régulation des récepteurs de type AMPA.

#### 1.4 – Contrôle bidirectionnel de la fonction glutamatergique

Il a été démontré que les synapses glutamatergiques possèdent une capacité limitée à produire le phénomène de la LTP. En d'autres termes la LTP est un processus saturable et nombreux sont les chercheurs à avoir démontré que la LTP peut se voir renversée lors de stimulations adéquates. Cette capacité que possèdent les synapses glutamatergiques à déprimer leurs réponses s'est avérée des plus remarquables lors de la période postnatale chez les rongeurs. Évidemment, les mécanismes cellulaires et

moléculaires à la base de la potentialisation ou de la dépression neuronale demeurent à être précisés.

Lisman et ses collaborateurs (1989) ont présenté un modèle expérimental qui établissait un rapport entre les variations quantitatives de calcium postsynaptique et la direction des changements d'efficacité neuronale. Il proposa que l'accumulation de calcium dans la structure postsynaptique entraîne une activation d'un ensemble de systèmes enzymatiques dépendants du calcium. Ces systèmes enzymatiques entraîneraient selon leur niveau d'activité, les phénomènes de dépression ou de potentialisation à long terme. Lors de la stimulation de haute fréquence, la concentration de calcium atteinte dans la cellule postsynaptique est très élevée, ce qui permettrait l'activation préférentielle des kinases endogènes dépendantes du calcium. Cette activation des systèmes de kinases semble conduire à l'induction du phénomène de potentialisation à long terme. Inversement, lors de l'application d'une stimulation de basse fréquence, l'accumulation postsynaptique de calcium est moindre et entraînerait l'activation de systèmes de protéines phosphatases. Selon Lisman, l'activation de phosphatases dépendantes du calcium conduirait à la formation du phénomène de dépression à long terme. Ainsi, la concentration de calcium postsynaptique constituerait l'élément clé de l'induction des phénomènes de plasticité synaptique (LTP et LTD). La modification de la transmission synaptique pouvant être une dépression ou une potentialisation à long terme.

Outre les kinases et les phosphatases, on attribue un rôle potentiel de la phospholipase A<sub>2</sub> concernant la direction des changements d'efficacité neuronale. En regard de la LTD, il a été démontré que les inhibiteurs de phospholipase A<sub>2</sub> affectent le développement de ce phénomène. Les mécanismes sous-jacents à la participation de la PLA<sub>2</sub> dans la LTD restent bien sûr à préciser. Des études ont toutefois démontré que cette enzyme est capable de réduire l'affinité des récepteurs AMPA lors de la période postnatale; une période reconnue pour favoriser le développement de la LTD. Fait intrigant, le processus de LTD chez les jeunes animaux se voit, à l'instar de la LTP, bloquée par des inhibiteurs de la phospholipase A<sub>2</sub> (Fitzpatrick et al., 1994, Normandin et al., 1996). Il est bien sûr intrigant qu'une même enzyme puisse contribuer au développement de phénomènes électrophysiologiques opposés en l'occurrence la LTP et la LTD. En fait, une bonne partie de cette thèse se penchera sur la possibilité d'une modulation différentielle des récepteurs AMPA dans ces deux phénomènes électrophysiologiques et ce, selon le degré d'activité de la phospholipase A<sub>2</sub>.



## Chapitre 2

### Hypothèses et objectifs

Dans plusieurs régions du cerveau, le phénomène de la LTP dépendrait essentiellement de l'activation des récepteurs NMDA, alors qu'une modification des propriétés fonctionnelles et/ou biochimiques des récepteurs AMPA représenterait une étape cruciale de l'expression à long terme de cette forme de plasticité synaptique. Par ailleurs, plusieurs évidences expérimentales ont permis de postuler que cette sensibilité accrue des récepteurs AMPA dans LTP résulte fort probablement de l'activation d'un ou plusieurs mécanismes dépendants du calcium, capables de modifier de façon permanente les propriétés de liaison de ces récepteurs. Nous savons, par exemple, que le traitement des membranes synaptiques avec des phospholipases exogènes produit une modification spécifique des caractéristiques de liaison du récepteur AMPA (Massicotte et al., 1990; Massicotte et al., 1992; Massicotte et Baudry, 1993) et bon nombre d'études ont démontré que les phospholipases endogènes participent à la formation de la LTP (Bernard, Lahsaini et Massicotte, 1994).

Malheureusement, aucune évidences expérimentales supportant l'idée d'un lien direct de la modulation du récepteur AMPA par les phospholipases endogènes sont disponibles à ce jour. Nous avons dans le cadre du présent travail tenté de vérifier si l'activation des phospholipases endogènes par divers composés est susceptible de contribuer à la régulation des récepteurs glutamatergiques de type AMPA et ce, dans une préparation de synaptoneurosomes. Les synaptoneurosomes sont des terminaisons nerveuses en suspension, dépourvues d'axones mais qui demeurent relativement intactes puisqu'elles se referment très rapidement pendant l'homogénéisation du tissu nerveux dans un milieu physiologique approprié. Les synaptoneurosomes nous offrent la possibilité d'étudier les mécanismes qui assurent la relâche des neurotransmetteurs ainsi que les différents systèmes de seconds messagers associés aux récepteurs membranaires. L'utilisation d'une telle préparation a démontré que l'activation des récepteurs métabotropes pour le glutamate se voit grandement modifiée dans le cortex visuel au cours du développement. Par ailleurs, il a été rapporté qu'une dépolarisation des synaptoneurosomes induite par le potassium, permet d'augmenter l'affinité des récepteurs AMPA pour ses agonistes.

Le premier volet de ce travail de doctorat visera donc essentiellement à établir si l'activation des phospholipases endogènes se voit capable de moduler les récepteurs AMPA dans le cerveau de rat. Pour ce faire nous aurons recours à l'utilisation de la mellétine, un puissant activateur de la phospholipase  $A_2$  afin d'établir les conditions

expérimentales optimales (concentrations de calcium, température) requises pour moduler le récepteur AMPA.

Le deuxième volet de cette étude portera pour sa part sur l'impact du développement de la régulation des récepteurs AMPA. Cet intérêt pour la période développementale repose essentiellement sur les diverses observations scientifiques montrant que la potentialisation à long terme est grandement réduite dans les premiers jours suivant la naissance chez le raton. Nous avons pris avantage de la préparation de synaptoneurosomes afin d'évaluer la modulation des récepteurs AMPA par les phospholipases endogènes. Ici une emphase particulière sera portée sur l'analyse de la régulation des récepteurs AMPA tant par la mellétine que par la dépolarisation chimique induite par le potassium. De plus, l'électrophysiologie constituera un outil de choix pour mettre en relation l'importance de la modulation des récepteurs AMPA et la capacité des neurones à produire le phénomène de la potentialisation neuronale lors du développement.

Une des questions importantes concernant le rôle des phospholipases dans la plasticité neuronale porte sur les mécanismes par lesquels cette même enzyme peut, par son activité, contribuer à la fois au phénomène de dépression et de potentialisation à long terme. Considérant l'importance de la régulation des récepteurs AMPA dans ces

processus électrophysiologiques, nous comptons établir dans le dernier volet de cette thèse, si la phospholipase A<sub>2</sub> est capable de moduler de façon différentielle les récepteurs AMPA et ce selon son activité. Nous tenterons notamment d'élucider le lien potentiel qui peut exister entre le degré de phosphorylation et la modulation des récepteurs AMPA par la phospholipase A<sub>2</sub>.

## Chapitre 3

### Résultats

#### CONTEXTE THÉORIQUE

De plus en plus d'évidences démontrent que le maintien des phénomènes de plasticité neuronale serait dû à une modification des propriétés des récepteurs AMPA. Reste à savoir quels mécanismes cellulaires et biochimiques pourraient être responsables des changements des propriétés du récepteur AMPA et ainsi permettre le maintien à long terme des phénomènes de plasticité neuronale.

Il a été démontré que des inhibiteurs de la phospholipase A<sub>2</sub> bloquent le phénomène de potentialisation à long terme (Linden, Sheu, Murakami et Routtenberg, 1987; Massicotte et al., 1990; Okada, Yamagishi et Sugiyama, 1989; Williams et al., 1989). De plus, l'application de phospholipase A<sub>2</sub> exogène sur une préparation membranaire, augmente l'affinité du récepteur AMPA pour son agoniste (Massicotte et al., 1990, 1992; Massicotte, Baudry et Hauge, 1991). Ces deux évidences mettent en cause un lien possible pouvant exister entre les phospholipases et la régulation des propriétés du

récepteur AMPA. Jusqu'à ce jour, aucune étude n'avait encore démontré la participation de la phospholipase  $A_2$  *endogène* dans la régulation des propriétés des récepteurs AMPA.

Le premier manuscrit s'intéresse au rôle des phospholipases endogènes dans les changements de propriétés des récepteurs AMPA. Ma contribution à cette publication a été l'évaluation de la modulation postnatale des récepteurs AMPA. Cet aspect développemental de la régulation des récepteurs au glutamate a servi de point de départ et représente le fondement de la présente thèse.

**MELITTIN INCREASES AMPA RECEPTOR AFFINITY IN RAT BRAIN  
SYNAPTONEUROSOMES**

Julie BERNARD <sup>a</sup>, Chantale CHABOT <sup>a</sup>, Joel GAGNÉ <sup>a</sup>, Michel BAUDRY <sup>c</sup> and Guy  
MASSICOTTE <sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Université du Québec à Trois-Rivières, Département de Chimie-Biologie, CP 500,  
Trois-Rivières, Qué. G9A 5H7 Canada

<sup>b</sup> Centre de Recherche Fernand Séguin, Montréal, Qué. H1N 3M5 Canada

<sup>c</sup> Program in Neurosciences, University of Southern California, Los Angeles, CA 90089-  
2520 USA

## Abstract

Recent experimental evidence suggest that phospholipase-induced changes in binding properties of the  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) subtype of glutamate receptors account for the increase in synaptic response observed in long-term potentiation (LTP). In the present study, we report that treatment of rat telencephalic synaptoneurosomes with the bee venom peptide melittin, a potent activator of endogenous phospholipases, increased [ $^3$ H]AMPA binding to the AMPA receptor. The action of melittin was concentration-dependent ( $EC_{50}$  value = 10  $\mu$ g/ml) and did not require the presence of extracellular calcium. Saturation kinetic experiments revealed that the increase in [ $^3$ H]AMPA binding produced by melittin was due to an enhancement in the affinity of the AMPA receptor, an effect markedly reduced by the phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) inhibitor bromophenacyl bromide (BPB). In contrast to BPB, inhibitors of cyclooxygenase and lipoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism did not interfere with the melittin-induced increase in [ $^3$ H]AMPA binding. In neonatal synaptoneurosomes, the effect of melittin on [ $^3$ H]AMPA binding was significantly reduced when compared to adult synaptoneurosomes, an effect which is consistent with the observation that LTP is not present in very young animals. The results indicate that activation of endogenous phospholipases may be an important mechanism in the regulation of AMPA receptor properties in LTP.



## Introduction

At glutamatergic synapses, fast excitatory synaptic transmission is generally mediated through the AMPA receptor, while the NMDA receptor, which exhibits a voltage-dependent magnesium blockade of the associated channel, is activated when sufficient postsynaptic depolarization occurs [11]. Glutamate receptors have been shown to be particularly important in the induction and expression of hippocampal long-term potentiation (LTP), a phenomenon often viewed as a cellular mechanism of learning and memory. Long-term potentiation, an increased synaptic efficacy following a brief tetanus of afferent fibers, is induced by activation of the NMDA receptors [2, 10, 13] which results in an influx of calcium [20, 21] and the stimulation of a variety of calcium-dependent enzymes [4, 6]. Electrophysiological studies have shown that the expression and maintenance of LTP are due to a selective increase in the component of synaptic responses mediated by the AMPA subtype of glutamate receptors [12, 17, 22, 30, 33, 35]. Furthermore, induction of LTP in the perforant path to the dentate gyrus in rats has been shown to be associated with an increased AMPA binding to the receptors [23, 36].

Given that LTP is a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent process, it has been postulated that calcium-activated enzymes may be responsible for producing the selective modification of AMPA receptors observed in LTP [4, 25]. Several arguments indicate that the calcium-dependent phospholipase A<sub>2</sub> participates in such selective changes in AMPA receptor

properties in LTP. Thus, PLA<sub>2</sub> inhibitors prevent the formation of stable LTP following theta-burst stimulation of the Schaffer collateral inputs to CA<sub>1</sub> pyramidal cells [19, 28, 31, 38], while treatment of telencephalic membranes with exogenous PLA<sub>2</sub> increases the affinity of AMPA receptor for agonists [24, 26, 29]. In addition, PLA<sub>2</sub>-induced increase in AMPA receptor binding does not occur before postnatal day 15 in telencephalic membranes [26] and the postnatal development time course of the PLA<sub>2</sub>-induced modification of AMPA receptors parallels that for LTP appearance in hippocampus [3]. Finally, LTP is impaired following seizure activity in limbic circuitries and the PLA<sub>2</sub>-induced modification of AMPA receptors in hippocampal membranes is likewise absent under these conditions [29].

There are, however, only few studies providing direct evidence for the involvement of endogenous phospholipases A<sub>2</sub> in the regulation of AMPA receptor properties in LTP. In particular, potassium (KCl)-induced depolarization of hippocampal slices is followed by a long-lasting increase in synaptic efficacy, an effect which occludes tetanus-induced LTP [14]. We reported that KCl-induced depolarization of rat telencephalic synaptoneurosomes resulted in an increased affinity of AMPA receptors, an effect which was calcium-dependent and blocked by the non-selective phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor, bromophenacyl bromide (BPB) [7, 9]. Furthermore, BPB prevented the potassium-induced increased synaptic efficacy in CA<sub>1</sub> hippocampal slices, as well as the increased

[<sup>3</sup>H]AMPA binding to hippocampal membranes that accompanied this type of potentiation [8]. BPB was also found to inhibit the glycine-induced potentiation of synaptic efficacy and the corresponding increased [<sup>3</sup>H]AMPA binding in rat hippocampal slices [34]. The involvement of endogenous phospholipase A<sub>2</sub> in the modulation of synaptic efficacy was also suggested by the report that melittin, a potent PLA<sub>2</sub> activator [15], increased the sensitivity of AMPA receptors in primary cultures of cerebellar neurons [1].

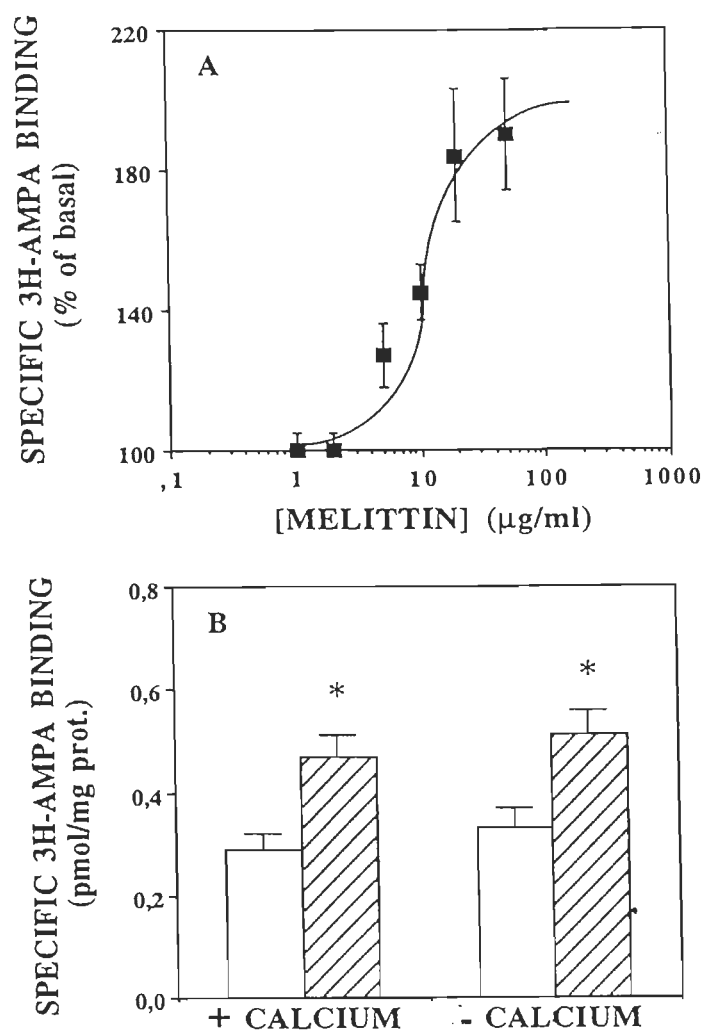
The goals of the present study were to determine: (i) whether AMPA receptor affinity is modulated by activating endogenous phospholipase A<sub>2</sub>; and (ii) whether such modulation may be age-dependent, as LTP is not observed at early stages of brain development in rats [3]. As AMPA receptors are presumably postsynaptic, we tested the effects of melittin treatment on the binding properties of AMPA receptors in rat brain synaptoneurosomes, a preparation which better maintains the structural organization of postsynaptic elements. The results indicate that melittin treatment of synaptoneurosomes enhances AMPA receptor affinity in adult but not in juvenile rats.

## Materials and methods

Synaptoneurosomes were prepared as previously described [16]. In brief, synaptoneurosomes were incubated at the indicated temperature for various periods of time in the presence of different concentrations of calcium and melittin. At the end of the incubation, synaptoneurosomes were centrifuged at  $20\,000 \times g$  for 15 min., the supernatants were discarded and the pellets were resuspended in 100 mM Tris-acetate buffer (pH = 7.4) containing 100  $\mu$ M EGTA; in some experiments, synaptoneurosomes were prepared and preincubated in normal medium containing various enzymatic inhibitors. They were washed twice by two cycles of centrifugation/resuspension under the same conditions and the final membrane suspension was used for binding assays.  $^3\text{H}$ -AMPA (spec. act. 60 Ci/mmol: NEN) and  $^3\text{H}$ -MK-801 (spec. act. 22 Ci/mmol: NEN) binding assays were performed as previously described [27], with the non-specific binding defined as that measured in the presence of 0.2 mM quisqualate and MK-801 respectively.

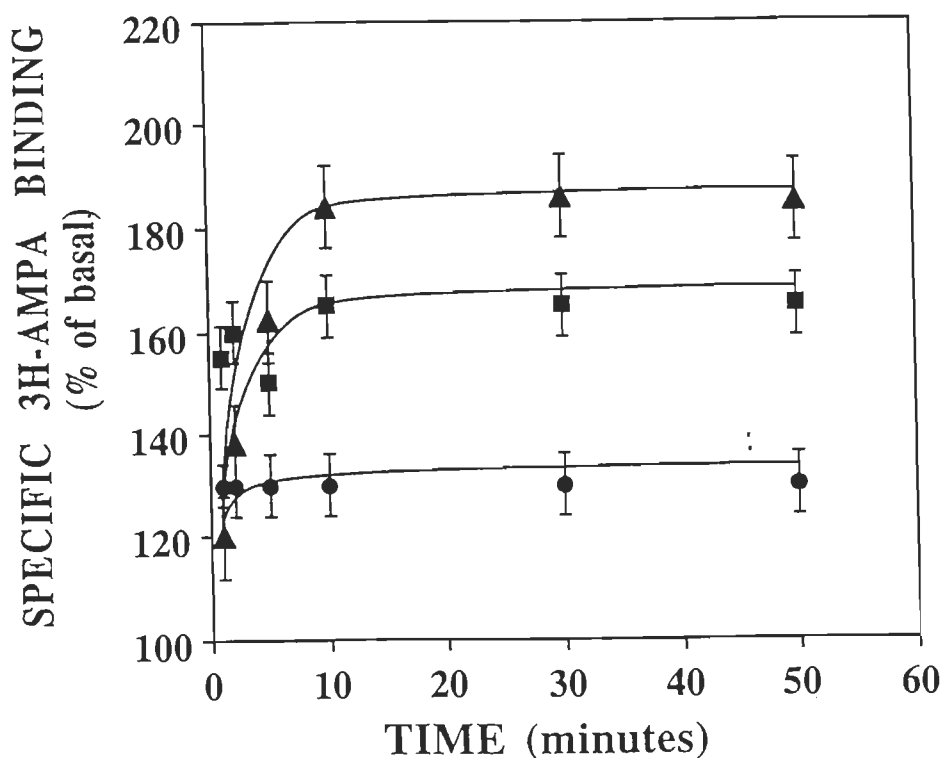
## Results

As previously reported [7, 9], potassium-induced depolarization of telencephalic synaptoneurosomes at 25°C increased [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding to membrane fractions by  $65 \pm 5\%$  (means  $\pm$  S.E.M. of five experiments). The PLA<sub>2</sub> activator, melittin, also increased [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding to the AMPA receptors after preincubation of synaptoneurosomes at 25 °C in a concentration-dependent manner with an apparent EC<sub>50</sub> value of 10  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 1A). In contrast to the depolarization-induced increase in [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding, the action of melittin on AMPA receptor did not require the presence of extracellular calcium [7]. Incubating synaptoneurosomes in calcium-free medium did not significantly reduce the effect of melittin on [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding (Fig. 1B).



**Figure 1.** Effect of melittin treatment on the binding of [ $^3\text{H}$ ]AMPA in rat synaptoneurosomes. **A**: synaptoneurosomes were prepared and preincubated at 25°C for 30 min in the presence of different concentrations of melittin. Synaptoneurosomes were then processed for [ $^3\text{H}$ ]AMPA (50 nM) binding as described previously [27]. Results are mean  $\pm$  S.E.M. of four experiments and are expressed as percentage of basal binding determined in membranes prepared from untreated synaptoneurosomes, which was  $0.35 \pm 0.04$  pmol/mg of protein. **B**: synaptoneurosomes were prepared and incubated at 25°C for 30 min in the presence (50mM) and absence of extracellular calcium without (open bars, control) or with (hatched bars) 10  $\mu\text{g/ml}$  melittin; 1 mM EGTA was also included to the medium without calcium. Results are expressed as pmol/mg of protein and are means  $\pm$  S.E.M. of 5 experiments. \*  $P < 0.05$  (Student's *t*-test), melittin-treated vs. control.

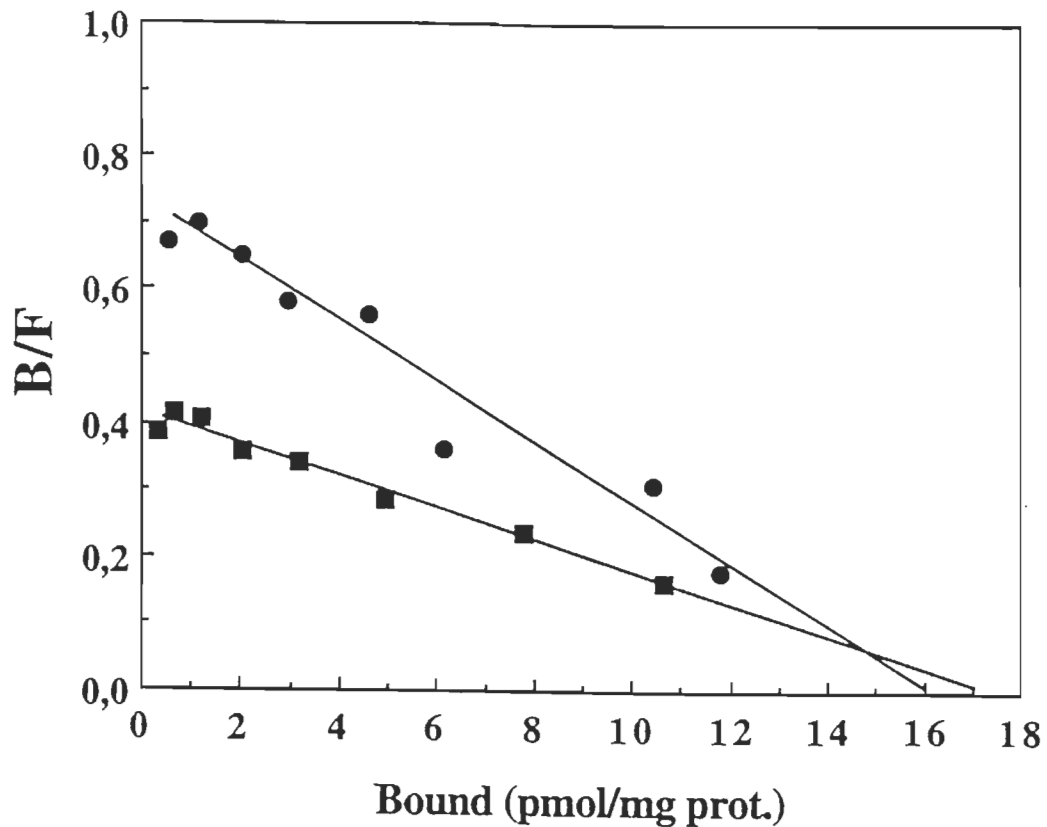
The effect of melittin on AMPA receptor was temperature-dependent, as reflected by a large reduction in the melittin-induced enhancement of [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding at 0°C. This modulation was also time-dependent, with a maximal increase in [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding occurring after 20-30 min of melittin treatment of rat brain synaptoneurosomes at 25°C (Fig. 2).



*Figure 2.* Effect of temperature on melittin-induced increase in [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding in rat synaptoneurosomes. Synaptoneurosomes were prepared and preincubated at different temperatures in the presence of 10  $\mu\text{g/ml}$  melittin for the indicated period of times: 0°C (closed circles), 25°C (closed squares), 35°C (closed triangles). Synaptoneurosomes were then processed for [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding as described previously [27]. Results are expressed as percentage of basal binding determined from untreated synaptoneurosomes and are means  $\pm$  S.E.M. of four experiments.

Scatchard analysis of the saturation curves generated with a range of [ $^3\text{H}$ ]AMPA concentrations indicated that the increase in [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding produced by melittin treatment of brain synaptoneurosomes was due to an increase in the affinity of AMPA receptors for agonists (Fig. 3), without a significant change in the maximal number of binding sites ( $K_d = 854 \pm 90$  nM and  $B_{\text{max}} = 16.5 \pm 2.0$  pmol/mg of protein in control synaptoneurosomes;  $K_d = 442^* \pm 39$  nM and  $B_{\text{max}} = 15.9 \pm 1.7$  pmol/mg of protein in melittin-treated synaptoneurosomes; means  $\pm$  S.E.M. of four experiments, \*  $P < 0.01$ , Student's  $t$ -test). Melittin-induced increase in AMPA receptor affinity was markedly attenuated in synaptic membranes ( $18 \pm 5\%$  increase at a concentration of  $20 \mu\text{g/ml}$  (mean  $\pm$  S.E.M. of four experiments), indicating that modulation of AMPA receptors in synaptoneurosomes reflect activation of cellular processes by melittin rather than direct actions of the compound or bee venom-derived PLA<sub>2</sub> contaminations on membranes [15].

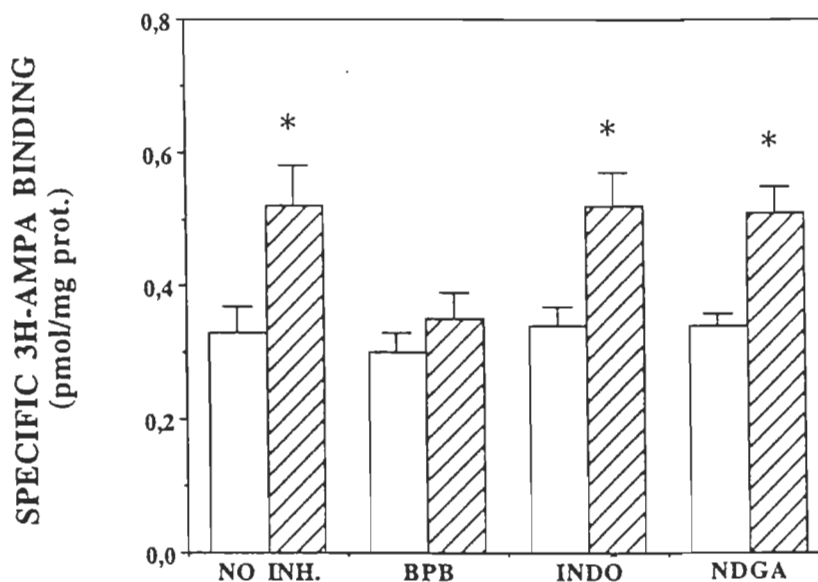




*Figure 3.* Effect of melittin treatment on the binding properties of AMPA receptor in rat synaptoneurosomes. The binding of increasing concentrations (40-10,000 nM) of [ $^3$ H]AMPA to synaptic membranes prepared from control (closed squares) and melittin-treated (closed circles) synaptoneurosomes were performed at 0°C for 45 min. Data were calculated as pmol/mg of protein and were plotted as a Scatchard plot (B/F, bound/free). Data were analyzed with the LIGAND program to generate  $K_d$  and  $B_{max}$ .

Binding of 10 nM [ $^3$ H]MK-801, a ligand for the NMDA receptor-associated channels, was not increased following melittin treatment of synaptoneurosomes when the channel was fully activated by high concentrations of glutamate and glycine ( $1.56 \pm 0.1$  pmol/mg of protein in control synaptoneurosomes vs.  $1.35 \pm 0.12$  pmol/mg of protein in melittin-treated synaptoneurosomes; means  $\pm$  four experiments).

To determine whether PLA<sub>2</sub> activation could be responsible for the effect of melittin on [<sup>3</sup>H]AMPA binding, synaptoneurosomes were preincubated in the presence of the PLA<sub>2</sub> inhibitor, bromophenacyl bromide (BPB), before and during melittin treatment. Preincubation with 100 μM BPB produced a marked reduction of the melittin-induced increase in [<sup>3</sup>H]AMPA binding to membrane fractions ( $6 \pm 4\%$  in BPB-treated vs  $45 \pm 5\%$  in control rat brain synaptoneurosomes). To further test for the involvement of the arachidonic acid cascade in the modulation of AMPA receptor properties by melittin, synaptoneurosomes were preincubated with 100 μM indomethacin or 100 μM nordihydroguaiaretic acid (NDGA) in order to block the cyclooxygenase or the lipoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism respectively. In contrast to the PLA<sub>2</sub> inhibitor BPB, neither indomethacin nor NDGA significantly altered the melittin-induced enhancement of [<sup>3</sup>H]AMPA binding in rat brain synaptoneurosomes (Fig. 4).

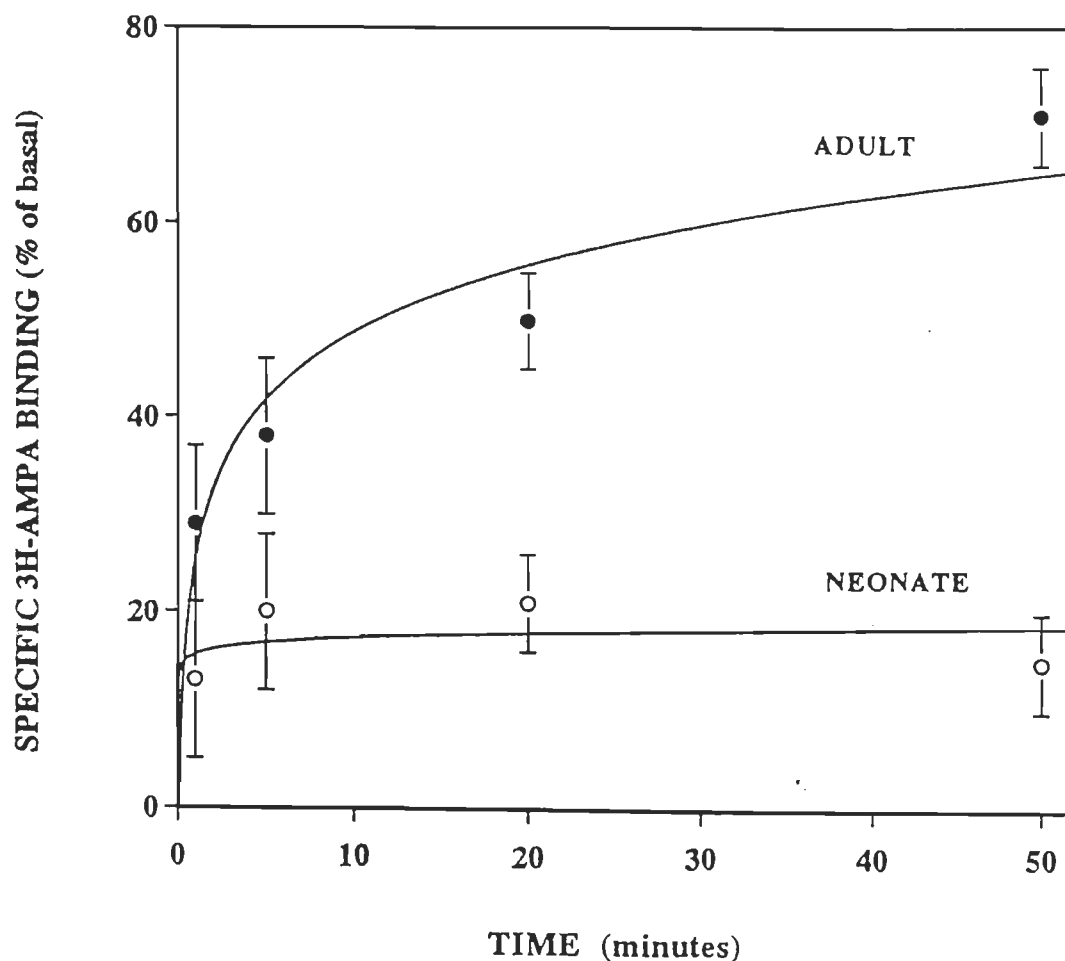


*Figure 4.* Effect of different inhibitors of the arachidonic acid cascade on the melittin-induced increase in [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding in rat synaptoneurosome. Synaptoneurosome were prepared and incubated at 25°C for 30 min in the presence of various inhibitors without (open bars, control) or with (closed bars) 10  $\mu\text{g/ml}$  melittin: bromophenacyl bromide (100  $\mu\text{M}$ ; BPB), indomethacin (100  $\mu\text{M}$ ; INDO), nordihydroguaiaretic acid (100  $\mu\text{M}$ ; NDGA). Synaptoneurosome were then processed for [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding as described previously [27]. Results are expressed as pmol/mg of protein and are means  $\pm$  S.E.M. of five experiments. \*  $P < 0.05$  (Student's  $t$ -test). Melittin-treated vs control.

In order to evaluate the possible role of phospholipid metabolites in the effect of melittin treatment of synaptoneurosome on [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding, we determined the effect of melittin in the presence of BSA (0.5%), since BSA is known to bind these metabolites. The effect of melittin (10  $\mu\text{g/ml}$ ) under these conditions was slightly but significantly reduced ( $59 \pm 7\%$  in the absence vs.  $42 \pm 5\%$  in the presence of BSA,

means  $\pm$  S. E. M. of five experiments; \*  $P < 0.05$ , Student's t-test), suggesting that, at least part of the melittin effect is mediated by an increase in phospholipid metabolites.

Since LTP is not present in neonatal hippocampus [3], we compared the effect of melittin treatment of synaptoneurosomes on [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding in neonatal (postnatal day 10-12) and adult rats. Synaptoneurosomes were prepared and preincubated for various periods of time in the presence of melittin (10  $\mu\text{g/ml}$ ). In adult rats, a significant increase in [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding was observed after 10 min of incubation with melittin and a maximal enhancement of  $65 \pm 5\%$  was observed after 50 min of treatment. In neonatal animals, the maximal effect of melittin on [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding was markedly reduced when compared to adult rats ( $65 \pm 5\%$  in adults vs  $20 \pm 5\%$  in neonatal synaptoneurosomes; mean  $\pm$  S.E.M. of five experiments) (Fig. 5).



*Figure 5.* Effect of melittin-induced increase in [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding in developing rat synaptoneurosomes. Synaptoneurosomes were prepared from neonatal (open circles) and adult (closed circles) and preincubated in the presence of 10  $\mu\text{g/ml}$  melittin for the indicated times. Synaptoneurosomes were then processed for [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding as described previously [27]. Results are expressed as percentage of basal binding determined from untreated synaptoneurosomes and are means  $\pm$  S.E.M. of four experiments.

## Discussion

We previously reported that treatment of synaptic membranes and of tissue sections with exogenous phospholipases increased [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding [24, 26, 27, 29, 37]. Few studies, however, have been performed to directly evaluate the role of endogenous phospholipases in modulating binding properties of AMPA receptors. We have addressed this question by using melittin, a bee venom peptide, which has been shown to potently activate endogenous PLA<sub>2</sub> [15], and rat brain synaptoneurosomes, as the AMPA receptors are presumably postsynaptic. Synaptoneurosomes exhibit a depolarization-induced increase in AMPA receptor affinity, which is blocked by a PLA<sub>2</sub> inhibitor [7, 9]. The present results indicate that treatment of rat brain synaptoneurosomes with melittin produces an increased affinity of AMPA receptor for its agonist, without significantly changing [ $^3\text{H}$ ]MK-801 binding to the NMDA receptor. The effect of melittin was independent of extracellular calcium, was significantly reduced by the PLA<sub>2</sub> inhibitor bromophenacyl bromide, but did not appear to be due to generation of prostanoid derivatives of fatty acids. However, the melittin effect was slightly reduced by the addition of BSA to the incubation medium, suggesting that the part of the effect could be due to the generation of phospholipid metabolites. Finally, the effect of melittin on AMPA receptor binding was markedly reduced in synaptoneurosomes prepared from neonatal animals.

Melittin has been shown to produce direct activation of PLA<sub>2</sub> and of other phospholipases including phospholipase C [15], and in view of the similarity of the effect of melittin and of exogenous PLA<sub>2</sub> and PLC on AMPA receptor binding [24, 27], it is logical to assume that the effect of melittin on synaptoneurosomes is mediated by endogenous phospholipases. This is consistent with its inhibition by BPB, which is generally considered a relatively non-specific phospholipase inhibitor, and with the observations that stimulation of endogenous PLC [15] and modulation of AMPA receptor affinity by melittin are both independent of extracellular calcium. On the other hand, the lack of effect of indomethacin and NDGA indicates that the effect of melittin on AMPA receptor binding is not mediated by arachidonic acid metabolites. A possible mechanism to account for the melittin-induced increase in AMPA receptor affinity could be a modification of the lipid environment of the receptor, resulting from phospholipase activation. We have shown previously that incorporation of phospholipids, especially phosphatidylserine, to telencephalic membranes results in an increased AMPA receptor binding [5]. In this respect, the reduced effect of melittin on AMPA receptor binding observed in synaptoneurosomes from young animals possibly reflects differences in lipid composition of plasma membranes [18], and agrees with the differential effect of PLA<sub>2</sub> treatment of synaptic membranes on AMPA receptor properties [26]. Alternatively, it has been shown that various AMPA receptor genes exhibit different spatial and temporal patterns of expression during the postnatal period [32] and it is possible that the reduced effect of melittin may also reflect the differential expression of AMPA receptor subunits.

Although melittin potently activates endogenous phospholipases, it has other pharmacological properties that could explain the effect of this drug on AMPA receptor [15]. For instance, melittin also inhibits the regulatory domain of protein kinase C and under certain conditions, acts as a calcium ionophore. However, it seems unlikely that these actions contribute to the effect of melittin on the affinity of AMPA receptor. First, we have previously reported that various inhibitors of calcium-dependent protein kinases, including protein kinase C inhibitors, do not increase basal [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding (if anything these inhibitors produced a slight decrease in [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding) or interfere with the depolarization-induced increase in AMPA receptor affinity in rat brain synaptoneurosomes [7]. Furthermore, the modulation of AMPA receptor affinity by melittin was independent of extracellular calcium. Finally, because commercial preparations of melittin may also contain some traces of phospholipase  $\text{A}_2$ , it is conceivable that the increase in [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding measured after melittin treatment could be due to  $\text{PLA}_2$  contamination. The observation that the melittin-induced change [ $^3\text{H}$ ]AMPA was markedly reduced in membrane preparations strongly suggests that the modulation of AMPA receptor properties in intact synaptoneurosomes most likely reflects melittin action on endogenous phospholipases.

In conclusion, our results further suggest a role for endogenous phospholipases in the modulation of AMPA receptor affinity and also in the mechanisms underlying LTP. As mentioned previously, LTP has been shown to be expressed by an increase in synaptic



currents mediated by AMPA receptors, with little change in those mediated by NMDA receptors [12, 17, 22, 30, 33, 35]. In this regard, it is of interest that treatment of rat synaptoneurosomes with the PLA<sub>2</sub> activator melittin, produced a marked increase in the affinity of the AMPA receptors, without changing the binding properties of an NMDA receptor/channel blocker. It has also been shown that the PLA<sub>2</sub> inhibitor bromophenacyl bromide caused a reduction in the magnitude of hippocampal LTP [19, 28, 31, 38] and the present results indicate that this inhibitor also reduced the melittin-induced increase in affinity of AMPA receptor in rat synaptoneurosomes. Finally, LTP is absent at early stages of brain development [3] and the melittin-induced increase in [<sup>3</sup>H]AMPA binding was markedly reduced in young animals. Further investigation of the mechanisms underlying the melittin-induced changes in AMPA receptor binding in synaptoneurosomes might thus provide interesting clues to understand the mechanisms underlying LTP.

## References

- [1] Aronica, E. , Casabona, G. , Genazzani, A. A., Catania, M. V., Contestabile, A., Virgili, M., & Nicoletti, F. (1992). Melittin enhances excitatory amino acid release and AMPA-stimulated  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx in cultured neurons. *Brain Research*, 586, 72-77.
- [2] Artola, A., Broecher, S., & Singer, W. (1990). Different voltage-dependent thresholds for inducing long-term depression and long-term potentiation in slices of rat visual cortex. *Nature*, 347, 69-72.
- [3] Baudry, M., Arst, D., Oliver, M., & Lynch, G. (1981). Development of glutamate binding sites and their regulation by calcium in rat hippocampus. *Brain Research*, 227, 37-48.
- [4] Baudry, M., & Massicotte, G. (1992). Physiological and pharmacological relationships between long-term potentiation and mammalian memory. *Conc. Neuroscience*, 3, 79-98.
- [5] Baudry, M., Massicotte, G., & Hauge, S. (1991). Phosphatidylserine increases the affinity of the AMPA/Quisqualate receptor in rat brain membranes. *Beha. Neural Biology*, 55, 137-140.
- [6] Baudry, M., Thompson, R. F., & Davis, J. L. (1993). *Book Synaptic Plasticity: Molecular, Cellular and Functional Aspects*, Cambridge : MIT Press.
- [7] Bernard, J., Lahsaini, A., Baudry, M., & Massicotte, G. (1993). The phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor bromophenacyl bromide prevents the depolarization-induced increase in [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding in rat brain synaptoneurosomes. *Brain Research*, 628, 1-2.
- [8] Bernard, J., Lahsaini, A., & Massicotte, G. (1994). Potassium-induced long-term potentiation in area CA<sub>1</sub> of the hippocampus involves phospholipase activation. *Hippocampus*, 447-453.
- [9] Bernard, J., Massicotte, G., & Baudry, M. (1992). Potassium-induced depolarization of rat telencephalic synaptoneurosomes increases [ $^3\text{H}$ ]AMPA receptor binding. *Journal of Neurochemistry*, 58, 387-389.

- [10] Collingridge, G. L., Kehl, S. J., & McLennan, H. (1983). Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol London.*, 334, 33-46.
- [11] Collingridge, G. L., & Singer, W. (1990). Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends in Pharmacological Science*, 11, 290-296.
- [12] Davies, S. N., Lester, R. A., Reymann, K. G., & Collingridge, G. L. (1989). Temporally distinct pre- and post-synaptic mechanisms maintain long-term potentiation. *Nature*, 338, 500-503.
- [13] Dudek, S. M., & Bear, M.F. (1992). Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 89, 4363-4367.
- [14] Fleck, M.W. , Palmer, A. M., & Barrionuevo, G. (1992). Potassium-induced long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Brain Research*, 580, 100-105.
- [15] Fletcher, J. E., & Jiang, M. (1993). Possible mechanisms of action of cobra snake venom cardiotoxins and bee venom melittin. *Toxicon*, 31, 669-695.
- [16] Hollingsworth, E. B., McNeal, E. T., Burton, J. L., Williams, R. J., Daly, J. W., & Creveling, C. R. (1985). Biochemical characterization of a filtered synaptoneurosome preparation from guinea-pig cerebral cortex: cyclic adenosine 3',5'-monophosphate generating systems, receptors, and enzymes. *Journal of Neuroscience*, 5, 2240-2253.
- [17] Kauer, J. A., Malenka, R. C., & Nicoll, R.A. (1988). A persistent postsynaptic modification mediates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuron*, 1, 911-917.
- [18] Lajtha, A. (1985). *Handbook of Neurochemistry*. New York : Plenum Press.
- [19] Linden, D. J., Sheu, F. S., Murakami, K., & Routtenberg, A. (1987). Enhancement of long-term potentiation by cis-unsaturated fatty acid: relation to protein kinase C and phospholipase A2. *Journal of Neuroscience*, 7, 3783-3792.
- [20] Lynch, G., Larson, J., Kelso, S., Barrionuevo, G., & Schottler, F. (1983). Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature*, 305, 20-26.
- [21] Malenka, R. C., Kauer, J. A, Zucker, R. S., & Nicoll, R. A. (1988). Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission., *Science*, 242, 81-84.

- [22] Manabe, T., Renner, P., & Nicoll, R. A. (1992). Postsynaptic contribution to long-term potentiation revealed by the analysis of miniature synaptic currents. *Science*, 355, 50-55.
- [23] Maren, S., Tocco, G., Standley, S., Baudry, M., & Thompson, R. F. (1993). Postsynaptic factors in the expression of long-term potentiation (LTP): increased glutamate receptor binding following LTP induction in vivo. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 90, 9654-9658.
- [24] Massicotte, G., & Baudry, M. (1990). Modulation of AMPA/Quisqualate receptors by phospholipase A2 treatment. *Neuroscience Letter*, 118, 245-248.
- [25] Massicotte, G., & Baudry, M. (1991). Triggers and substrates of hippocampal synaptic plasticity. *Neuro. Biobehav. Rev.*, 15, 415-423.
- [26] Massicotte, G., Bernard, J., & Baudry, M. (1992). Postnatal changes in AMPA receptor regulation by phospholipase A2 treatment of synaptic membranes: temporally differential effects on agonist and antagonist binding. *Developmental Brain Research*, 66, 203-208.
- [27] Massicotte, G., Kessler, M., Lynch, G., & Baudry, M. (1990). N-Methyl-D-Aspartate and Quisqualate/AMPA receptors: Differential regulation by Phospholipase C treatment. *Molecular Pharmacology*, 32, 278-285.
- [28] Massicotte, G., Oliver, M. W., Lynch, G., & Baudry, M. (1990). Effect of bromophenacylbromide, a Phospholipase A2 inhibitor, on the induction and maintenance of LTP in hippocampal slices. *Brain Research*, 537, 49-53.
- [29] Massicotte, G., Vanderklish, P., Lynch, G., & Baudry, M. (1991). Modulation of AMPA/Quisqualate receptors by Phospholipase A2: a necessary step in long-term potentiation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 88, 1893-1897.
- [30] Muller, D., Joly, M., & Lynch, G. (1988). Contributions of quisqualate and NMDA receptors to the induction and expression of LTP. *Science*, 242, 1694-1697.
- [31] Okada, D., Yamagishi, S., & Sugiyama, H. (1989). Differential effects of phospholipase inhibitors in long-term potentiation in the rat hippocampal mossy fiber synapses and Schaffer/commissural synapses. *Neuroscience Lett.*, 100, 141-146.
- [32] Pellegrini-Giampietro, D. E., Bennett, M. V. L., & Zukin, R.S. (1991). Differential expression of three glutamate receptor genes in developing rat brain: An in situ hybridization study. *Proc. Natl. Acad. Science. USA*, 88, 4157-4161.

- [33] Shahi, K., & Baudry, M. (1992). Increasing binding affinity of agonists to glutamate receptors increases synaptic responses at glutamatergic synapses. *Proc. Natl. Acad. Science USA*, 89, 6881-6885.
- [34] Shahi, K., & Baudry, M. (1993). Glycine-induced changes in synaptic efficacy in hippocampal slices involve changes in ampa receptors. *Brain Research*, 627, 261-266.
- [35] Staubli, U., Kessler, M., & Lynch, G. (1990). Aniracetam has proportionately smaller effects on synapses expressing long-term potentiation: evidence that receptor changes subserve LTP. *Psychobiology*, 18, 377-81.
- [36] Tocco, G., Maren, S., Shors, T., Baudry, M., & Thompson, R. F. (1992). Long-term potentiation is associated with increased [<sup>3</sup>H]AMPA binding in rat hippocampus. *Brain Research*, 573, 228-234.
- [37] Tocco, G., Massicotte, G., Standley, S., Thompson, R. F., & Baudry, M. (1992). Phospholipase A2-induced changes in the affinity of the AMPA receptor: an autoradiographic study. *Neuroreports*, 3, 515-518.
- [38] Williams, J. H., & Bliss, T. V. (1989). An in vitro study of the effect of lipxygenase and cyclo-oxygenase inhibitors of arachidonic acid on the induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *Neurosci Lett.*, 107, 1-3.

## CONTEXTE THÉORIQUE

Suite à cette première étude, nous pouvons conclure que la mellétine pourrait être un outil pharmacologique avantageux pour déterminer les processus biochimiques assurant la régulation des récepteurs AMPA. Par ailleurs, il a été démontré que la potentialisation à long terme au niveau de l'hippocampe chez le rat, suit un profil de développement bien précis. En particulier, on note que le phénomène est absent durant les huit premiers jours suivant la naissance et apparaît environ au 10<sup>ème</sup> jour, période à partir de laquelle il s'établit de manière permanente (Baudry et al., 1981; Harris et Teyler, 1984). Nous avons donc voulu vérifier si les changements dans la liaison de l'agoniste au récepteur AMPA dans le contexte de la LTP suivent eux aussi un tel profil de développement.

Cet aspect développemental de la régulation des récepteurs au glutamate est l'objet principal de la prochaine publication. La conception du projet ainsi que la majorité des expériences ont été réalisées par l'auteur. Cette contribution a permis de proposer qu'une modification des propriétés des récepteurs AMPA via les phospholipases endogènes est cruciale dans les phénomènes de plasticité neuronale et pourrait expliquer le déficit du mécanisme de potentialisation à long terme au cours de la période néonatale chez le rat.

**DEVELOPMENTAL CHANGES IN DEPOLARIZATION-MEDIATED AMPA  
RECEPTOR MODIFICATIONS AND POTASSIUM-INDUCED LONG-TERM  
POTENTIATION**

Chantale Chabot <sup>a</sup>, Julie Bernard <sup>a</sup>, Manon Normandin <sup>b</sup>, Maurice Ohayon <sup>d</sup>, Michel  
Baudry <sup>c</sup>, Guy Massicotte <sup>a, b, d</sup>

<sup>a</sup> Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500,  
Trois-Rivières, Qué. G9A 5H7, Canada

<sup>b</sup> Centre de Recherche Fernand-Séguin, Montréal, Qué. H1N 3M5, Canada

<sup>c</sup> Program in Neurosciences, University of Southern California, Los Angeles, CA 90089-  
2520, USA

<sup>d</sup> Centre de Recherche de l'Institut Philippe Pinel de Montréal, Montréal, Qué. H1C 1H1,  
Canada

### Abstract

In the present study, we examined the KCl-induced increase in [ $^3\text{H}$ ]amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate ([ $^3\text{H}$ ]AMPA) binding in telencephalic synaptoneurosomes and potentiation of synaptic transmission (KLTP) in hippocampal slices during development in rats. As previously reported, KCl-induced depolarization of telencephalic synaptoneurosomes resulted in a  $40 \pm 5\%$  increase in [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding to membrane fractions in adult rats (3 months old). KCl-induced increase in [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding was reduced to  $24 \pm 5\%$  and  $15 \pm 5\%$  at postnatal days (PND) 25-30 and PND 15-20 respectively, and was only  $6 \pm 5\%$  at PND 5-10. KLTP in area CA<sub>1</sub> of hippocampus was most pronounced in adult slices ( $40 \pm 5\%$ ), and was reduced to  $30 \pm 5\%$  in slices prepared from PND 25-30 animals; KCl-induced LTP was absent in CA<sub>1</sub> hippocampal slices prepared from PND 5-10 animals ( $3 \pm 5\%$ ). The decrease in KCl-induced changes in AMPA receptor binding in young animals was also associated with an altered capacity of the bee venom peptide, melittin (a phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) activator), to increase [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding in synaptoneurosomes. The smaller effect of melittin on [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding in young animals was not due to a decreased ability of this peptide to release [ $^3\text{H}$ ]arachidonate from synaptoneurosomes. The parallel modifications in the extent of depolarization-induced change in AMPA receptor binding and excitatory synaptic transmission during development further support the hypothesis



that alterations in AMPA receptor properties may play a critical role in synaptic plasticity.

## Introduction

Information storage in the central nervous system is widely believed to occur as a result of changes in the efficacy of synaptic connections between neurons. Hippocampal long-term potentiation (LTP) is a relatively long-lasting increase in synaptic efficacy that represents one of the main cellular candidates for memory storage [30, 34, 40]. In area CA<sub>1</sub> of the hippocampus, it is generally admitted that sufficient dendritic depolarization is required for *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activation [9, 21] and the resulting calcium influx into postsynaptic cells, which provides the intracellular trigger for LTP [25, 27]. Moreover, LTP expression appears to be partly elicited by a modification of postsynaptic currents mediated by the  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazolepropionate (AMPA) subtype of glutamate receptors [10, 19, 35]. In particular, recent studies have proposed that LTP formation may involve appearance of functional AMPA receptors that, prior to LTP, were either not present in the postsynaptic membrane or electrophysiologically silent [18, 23]. This mechanism is obviously consistent with previous observations that LTP in the rat hippocampus is associated with increased binding of [<sup>3</sup>H]AMPA to the glutamate/AMPA receptors [7, 28, 41].

Given that LTP is a calcium-dependent process, it has been postulated that calcium-activated enzymes are responsible for producing selective modifications of AMPA receptor properties in LTP. Several arguments indicate that the calcium-dependent

phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) participates in biochemical cascades that produce selective changes in AMPA receptor properties in LTP. For instance, stimulation of NMDA receptors elicits an increased release of arachidonic acid, probably as a result of PLA<sub>2</sub> activation [12, 13], whereas inhibitors of this enzyme block LTP formation [7, 32, 36, 43]. Preincubation of synaptic membranes with exogenous phospholipases resulted in a selective increase in AMPA receptor binding similar to that seen with LTP [29, 31]. Moreover, PLA<sub>2</sub>-induced increases in AMPA receptor binding do not occur in hippocampal membranes after the development of seizure activity in limbic circuits, and LTP is likewise absent under this condition. Finally, melittin, a potent PLA<sub>2</sub> activator, increases both the sensitivity [1] and the affinity [5] of AMPA receptors for agonists.

Attempts to directly evaluate the role of specific endogenous processes for regulating AMPA receptor properties in tetanus-induced LTP face the problem of stimulating a sufficiently large percentage of synapses to produce detectable biochemical effects. In previous studies, we obviated this problem by eliciting LTP of synaptic transmission in CA<sub>1</sub> hippocampal slices with a short increase in extracellular KCl concentration [7]. This form of LTP (thereafter referred to as KLTP) displays many of the features that characterize LTP induced by electrical stimulation such as its long duration, the involvement of NMDA receptors and calcium dependence. Furthermore, the induction of one form of LTP totally prevents the subsequent development of the other (occlusion criterion), which strongly suggests that both types of potentiation share a common

mechanism [7, 15]. In this respect, we found that the PLA<sub>2</sub> inhibitor bromophenacyl bromide (BPB) prevented both tetanus-induced LTP and KLTP in CA<sub>1</sub> hippocampal slices, as well as the increased [<sup>3</sup>H]AMPA binding to hippocampal membranes that accompanies KLTP [7].

Developmental studies have shown that LTP in rat hippocampus exhibits a specific developmental profile. In particular, LTP is absent in the first 8 postnatal days (PND) in area CA<sub>1</sub> of the hippocampus and appears after postnatal day 10-11 [3, 16]. The inability of Schaffer collateral/commissural synapses of the hippocampus to display LTP in young rats could reflect altered cellular processes associated with LTP expression or the lack of mechanisms involved in LTP induction, such as calcium influx through the NMDA receptor channel. Reduced PLA<sub>2</sub> activity or the dissociation between PLA<sub>2</sub> activity and receptor modulation could also account for the lack of LTP in young animals. In the present study we evaluated age-dependent changes in the extent of KLTP in hippocampal slices and the KCl-induced increase in AMPA receptor binding in synaptoneurosome. We also determined endogenous phospholipase activity by measuring [<sup>3</sup>H]arachidonate release evoked by the bee venom peptide melittin, a potent PLA<sub>2</sub> activator, in neonatal synaptoneurosome. Our results suggest that the reduced LTP magnitude observed during the developmental period may reflect a dissociation between PLA<sub>2</sub> activity and AMPA receptor modulation.

## Materials and methods

### Synaptoneurosomes preparation and binding assays

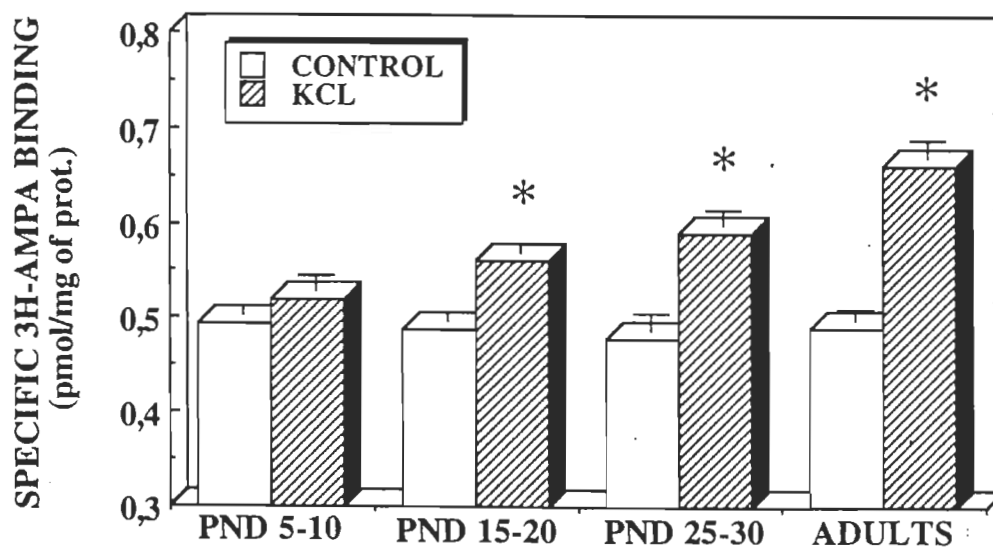
Synaptoneurosomes were prepared as described previously [17]. They were incubated at 22°C for 45 min under basal (addition of 3 mM KCl) or depolarized conditions (50 mM KCl); in some experiments they were prepared and preincubated in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing various concentrations of melittin (Sigma, St. Louis, MO, USA). At the end of incubation, synaptoneurosomes were centrifuged at 20 000 X g for 15 min; the supernatants were then discarded, and the pellets resuspended in 40 mM Tris-acetate buffer (pH 7.4) containing 100  $\mu$ M EGTA. They were washed twice by two cycles of centrifugation/resuspension under the same conditions, and the final membrane suspension was used for binding assays. [ $^3$ H]AMPA (NEN, sp. act. 60 Ci/mmol) binding assays were performed as described previously with non specific binding defined as that measured in the presence of 0.2 mM quisqualate. The use of [ $^3$ H]arachidonic acid for determination of phospholipase activity was performed as described by Verity et al. [42]. In brief, synaptoneurosomes were labeled for 1 h in complete ACSF containing 200 nM [ $^3$ H]arachidonate. After  $^3$ H incorporation, synaptoneurosomes were washed three times and resuspended in 500  $\mu$ l ACSF containing or not various concentrations of mellitin. Following incubation at 35°C for appropriate periods of time, 200  $\mu$ l of supernatant were removed and transferred to a scintillation vial for radioactivity determination. All assays were performed in triplicate.

### CA<sub>1</sub> hippocampal slice preparation for electrophysiology

In vitro hippocampal slices were prepared and maintained as described previously [22]. Briefly, Sprague-Dawley rats from different developmental stages were ether-anesthetized and their brains removed and placed into cooled ACSF. The hippocampus was dissected free and 500  $\mu\text{m}$  slices were cut perpendicularly to the septotemporal axis and parts of the CA<sub>3</sub> and dentate gyrus regions were removed. CA<sub>1</sub> slices were placed in a recording chamber and perfused continuously (1.5 ml/min) with an ACSF oxygen/carbon dioxide gas mixture (95% /5%) at 32°C. Normal ACSF consisted of (in mM): NaCl 125, KCl 5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, MgCl<sub>2</sub> 1.5, CaCl<sub>2</sub> 2.0, NaHCO<sub>3</sub> 26, glucose 10 and ascorbate 2.0. The high-potassium medium contained 50 mM KCl, with an equimolar reduction of NaCl concentration. After at least 45 min of equilibration, a glass recording electrode (1-5 M $\Omega$ , filled with 2.0 M NaCl) was positioned into the stratum radiatum (SR) of the CA<sub>1</sub> subregion. A bipolar stimulating electrode (twisted 60  $\mu\text{m}$  Nichrome) was placed in the SR on the subicular side of the recording locus, for the orthodromic stimulation of Schaffer/collateral/commissural afferents. Stimulus intensity was adjusted to evoke a 0.7 mV population excitatory post-synaptic potentials (EPSPs). EPSP slope values were calculated by computer and stored on disk. The stimulating electrode was activated every 20 sec. and baseline responses were recorded for a minimum of 10-15 min prior to the application of a 3 min pulse of high-KCl medium (50 mM).

## Results

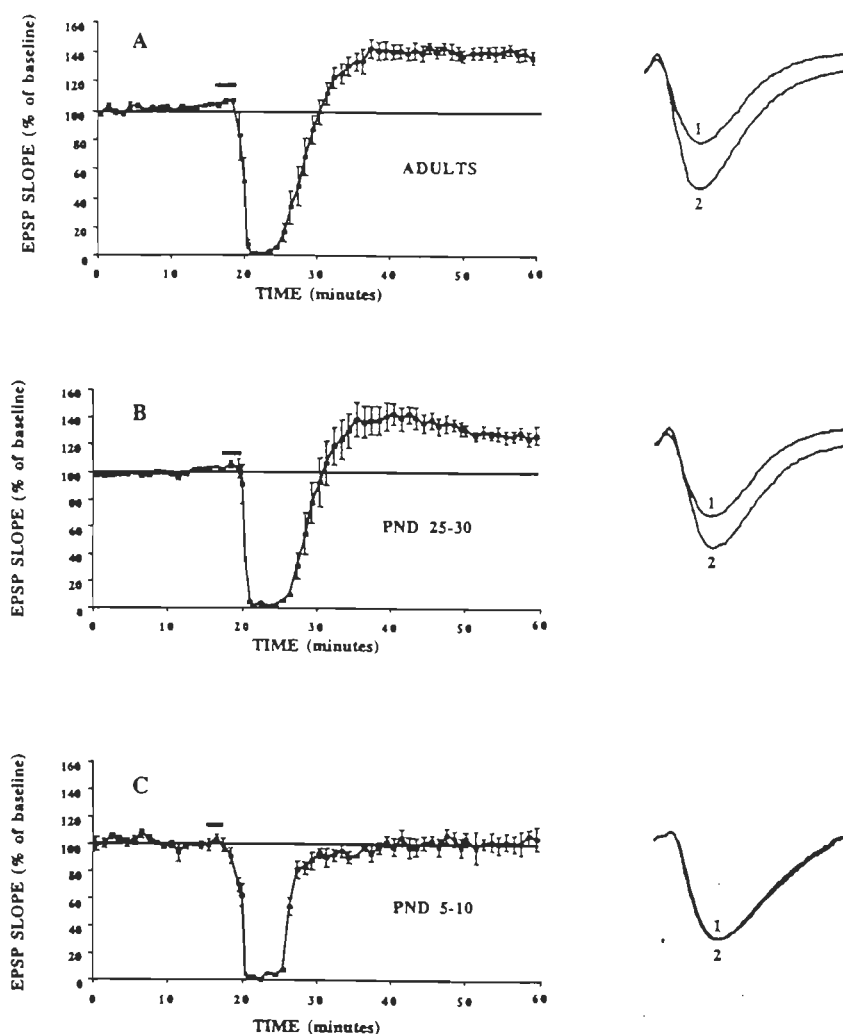
We evaluated the effect of KCl-induced depolarization on AMPA receptor binding in telencephalic synaptoneurosomes prepared from animals of different postnatal ages (Fig. 1). As reported previously, KCl-induced depolarization of adult synaptoneurosomes resulted in a  $40 \pm 5\%$  (mean  $\pm$  SEM) increase in  $^3\text{H}$ -AMPA binding to membrane fractions [6, 8]. The effect of KCl depolarization on  $^3\text{H}$ -AMPA binding was reduced to  $24 \pm 5\%$  and  $15 \pm 5\%$  at PND 25-30 and PND 15-20, respectively, and it was only  $6 \pm 5\%$  at PND 5-10.



*Figure 1.* Effect of KCl-induced depolarization on  $^3\text{H}$ -AMPA binding in developing rat synaptoneurosomes. Synaptoneurosomes were prepared from telencephalon of rats of the indicated postnatal ages and were preincubated in the absence (open bars) and presence (hatched bars) of 50 mM KCl at 22°C for 45 min. They were then processed for  $^3\text{H}$ -AMPA binding as described in Materials and methods. The results are expressed as pmol/mg of protein and are means  $\pm$  S.E.M. of seven experiments. \*  $P < 0.05$  (Student's *t*-test); depolarized vs. control.

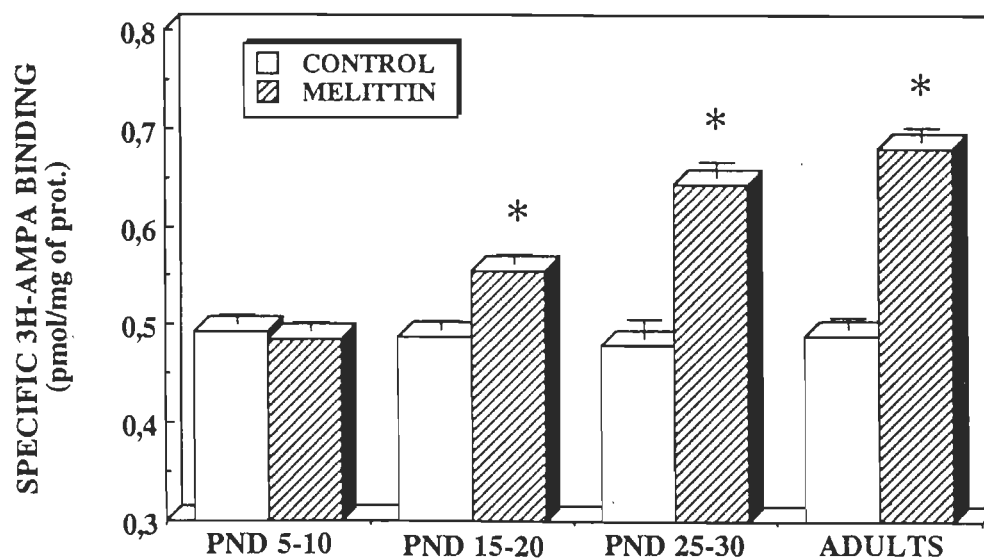
To examine whether the modulation of AMPA receptor binding was associated with alterations in synaptic plasticity, we determined the magnitude of hippocampal KLTP at various developmental ages. Fig. 2 illustrates the results of experiments (7-9 animals) performed on CA<sub>1</sub> hippocampal slices prepared from PND 5-10, 25-30 and adult rats. Brief exposure of adult CA<sub>1</sub> hippocampal slices to ACSF containing 50 mM KCl (Fig. 2A) caused an initial complete depression of synaptic responses as a result of depolarization. Synaptic responses started to recover 5-7 min after KCl application and reached baseline value 4-5 min later. By 20 min post-KCl treatment, synaptic responses were clearly increased compared to baseline ( $40 \pm 5\%$ ) and remained elevated for at least 20 min of additional testing. The magnitude of KLTP was reduced in slices prepared from PND 25-30 animals, when compared to adult slices. By 40 min post-KCl treatment, the magnitude of KLTP was reduced to  $30 \pm 4\%$ . In slices prepared from 5-10-day-old rats, there was no significant increase in synaptic efficacy ( $3 \pm 5\%$ ) in response to KCl depolarization.





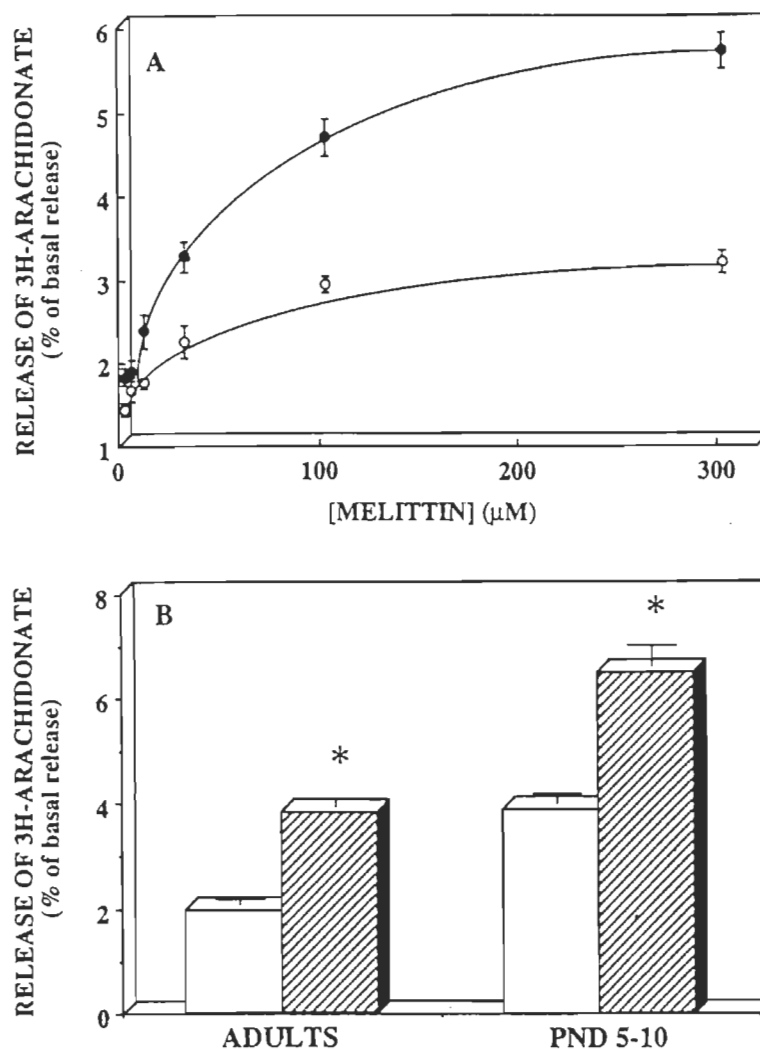
*Figure 2.* Effect of development on KCl-induced LTP in area CA1 of the hippocampus. Field EPSPs were recorded in stratum radiatum of CA1 pyramidal cells at various developmental stages. A : In adult slices, EPSP slope exhibited a 40% potentiation 20 min after exposure to high KCl (50 mM) and remained elevated afterwards. B : In slices prepared from PND25-30 animals, the slope exhibited a 40% potentiation 20 min after exposure to high KCl which is reduced to 30% by 40 min post-KCl treatment. C : In slices prepared from PND 5-10 animals, there was no significant increase in synaptic efficacy in response to KCl-induced depolarization. Traces on the right were recorded before (1) and 40 min (2) after KCl exposure. The horizontal bars indicate the time during which 50 mM KCl was applied. Data are expressed as percentages of the baseline value and each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 7-9 experiments.

We recently reported that treatment of adult rat synaptoneurosomes with melittin [5], a potent activator of endogenous phospholipases, increased [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding, an effect blocked by the PLA<sub>2</sub> inhibitor BPB. Fig. 3 illustrates the effects of melittin on AMPA receptor binding in synaptoneurosomes prepared from rats of different postnatal ages. The melittin-induced enhancement of [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding was maximal in adult rats; the increase in [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding was substantially reduced at PND 25-30 and virtually absent at PND 5-10.



*Figure 3.* Effect of mellitin on [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding in developing rat synaptoneurosomes. Synaptoneurosomes were prepared from telencephalon of rats of the indicated postnatal ages and were preincubated in the absence (open bars) and presence (hatched bars) of 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$  melittin at 22°C for 45 min. They were then processed for [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding as described in Materials and methods. The results are expressed as pmol/mg of protein and are means  $\pm$  S.E.M. of seven experiments. \*  $P < 0.05$  (Student's *t*-test) mellitin vs. control.

The results prompted us to examine the possibility that the apparent reduction in modulation of AMPA receptor binding by melittin treatment could be due to reduced phospholipase activity in young rats. Incubation of adult synaptoneurosomes for 1h in the presence of [ $^3$ H]arachidonate resulted in a significant lipid incorporation of arachidonic acid ( $123 \pm 15 \times 10^3$  dpm/mg of protein), and a basal release corresponding to about 2% of total [ $^3$ H]arachidonate incorporation. Melittin produced a concentration-dependent stimulation of [ $^3$ H]arachidonate release (Fig. 4). A significant effect was observed at melittin concentrations greater than 3.0  $\mu$ g/ml, with maximal enhancement reached at 100  $\mu$ g/ml. BPB markedly reduced the melittin-induced release of [ $^3$ H]arachidonate (Fig. 4A), confirming the important role of endogenous PLA<sub>2</sub> in this effect. In young rats (PND 5-10), basal [ $^3$ H]arachidonate release was increased ( $3.8 \pm 0.2\%$ ) when compared to adults ( $1.96 \pm 0.10\%$ ; N=7). However, no significant differences in the capacity of melittin (20  $\mu$ g/ml) to release [ $^3$ H]arachidonate were observed in telencephalic synaptoneurosomes prepared from young rats (Fig. 4B).



**Figure 4.** Effect of melittin on [ $^3$ H]arachidonate release in rat synaptoneurosomes. **A :** Adult synaptoneurosomes were prepared and preincubated for 1 h in the presence of 200nM [ $^3$ H]arachidonate, washed, and incubated in the absence or presence of the indicated concentrations of mellitin at 35°C for 45 min. Supernatants were collected by centrifugation and analysed for [ $^3$ H]arachidonate release as described under Materials and methods. The results are expressed as percentages of basal release from untreated synaptoneurosomes and are means  $\pm$  S.E.M. of five experiments. Mellitin-induced [ $^3$ H]arachidonate release was assessed in the absence (closed circles) and presence (open circles) of 100  $\mu$ g/ml BPB. **B :** Synaptoneurosomes prepared from adult and neonatal (PND 5-10) telencephalon were preincubated in the absence (open bars) or presence (hatched bars) of 20  $\mu$ g/ml mellitin at 35°C for 45 min. Supernatants were collected by centrifugation and analysed for [ $^3$ H]arachidonate release. Values are expressed as percentages of [ $^3$ H]arachidonate release and are means  $\pm$  S.E.M. of five experiments.

\* $P < 0.05$  (Student's *t*-test) mellitin vs. control.

## Discussion

Recent experimental evidence suggest that changes in binding properties of the AMPA subtype of glutamate receptors participate in the increase in synaptic responses observed with LTP. The present results further support this notion by indicating that potentiation of synaptic responses in area CA<sub>1</sub> of the hippocampus and modulation of AMPA receptor binding in telencephalic synaptoneurosomes following KCl-induced depolarization are markedly reduced in neonatal as compared to adult rats. Moreover, both phenomena follow a similar developmental profile which could reflect developmental changes in the modulation of AMPA receptors by endogenous PLA<sub>2</sub>. Accordingly, telencephalic synaptoneurosomes prepared from neonatal animals exhibited a significant reduction in the ability of melittin to modulate AMPA receptor binding. As melittin stimulated arachidonic acid release as effectively in neonatal as in adult synaptoneurosomes, the reduced ability of melittin to modify AMPA receptor binding cannot be accounted for a decreased PLA<sub>2</sub> activity in neonatal brain. Rather, it suggests that alterations in AMPA receptor properties or in the link between PLA<sub>2</sub> activity and the receptors during the developmental period are responsible for the observed effects.

Whether the site of expression for LTP at the Schaffer collateral-CA<sub>1</sub> pyramidal cell synapse is pre- or post-synaptic has been the subject of intense controversy. Recent studies have suggested that some proportion of excitatory synapses on hippocampal CA<sub>1</sub>

neurons that express NMDA receptors may not express AMPA receptors, thus making these synapses silent at the resting membrane potential. It has been proposed that when these silent synapses are subjected to high-frequency stimulation, these synapses acquire AMPA-type responses, leading to the functional addition of AMPA receptors in LTP [18, 23]. Determining the exact mechanisms by which synapses devoid of detectable AMPA receptors become responsive during LTP will continue to be the subject of intense investigation. Possible mechanisms include the appearance of new functional AMPA receptors in the dendritic spine, uncovering of receptors already present into the membranes and changes in the affinity or biophysical properties of preexisting receptors. It is of interest that modulation of AMPA receptors in brain synaptoneurosomes is virtually absent in very young animals. The present data would provide a simple explanation for the observed reduction in LTP during development, in as much as a modification in binding properties would be reflected in a change in physiological responses mediated through the AMPA receptors. Indeed, an increased affinity of AMPA receptors for agonists has been associated with an increase in physiological responses elicited by the endogenous transmitter in area CA<sub>1</sub> of hippocampal slices. Interestingly, we presented evidence that the PLA<sub>2</sub>-induced increase in AMPA receptor affinity is reduced in various conditions characterized by LTP impairment [29, 30].

Numerous studies have shown that [<sup>3</sup>H]AMPA labels two populations of sites with different affinities; a high affinity site with a K<sub>d</sub> of approximately 10 nM and a low

affinity site with a  $K_d$  of around 500 nM. Subcellular fractionation and quantitative autoradiography studies have indicated that high affinity binding sites are more abundant in juvenile rats as compared to adults [38, 39]. High affinity sites have been proposed to represent receptors which have recently been synthesized and assembled, and which may be located in vesicle structures as well as somatic plasma membranes before being incorporated in synaptic membranes as functional receptors. It is possible that the differential effects of AMPA receptor binding of KCl-induced depolarization of synaptoneurosomes or PLA<sub>2</sub> treatment of membranes in neonates and adult rats reflect different regulation of these two populations of receptors. In particular, mechanisms involved in receptor insertion and internalization are likely to be affected by intracellular calcium, phospholipids and developmental stage. We have also previously shown that incorporation of phospholipids, especially phosphatidylserine, into telencephalic membranes results in increased AMPA receptor binding [4]. Thus, the reduced effect of melittin on AMPA receptor binding observed in synaptoneurosomes from young animals could reflect differences in lipid composition of plasma membranes [20]. Moreover, it has been shown that various AMPA receptor genes exhibit different spatial and temporal patterns of expression during the postnatal period [33, 37, 39] and it is possible that the reduced effect of melittin may also be the result of differential expression of AMPA receptor subunits.

The absence of KLTP as well as of tetanus-induced LTP in very young rats could be related to the enhanced capacity of juvenile rats to exhibit long-term depression (LTD) in hippocampus. Like LTP, LTD in area CA<sub>1</sub> of hippocampus requires NMDA receptor activation and changes in postsynaptic calcium concentration [2, 24]. It is generally admitted that both LTP and LTD induction require sufficient dendritic depolarization to activate the NMDA subtype of glutamate receptors and produce an influx of calcium into postsynaptic structures, the amplitude of the calcium signal being critical to determine the direction of the change in synaptic efficacy [2, 24]. As LTD expression in area CA<sub>1</sub> of the hippocampus is more easily reproduced in juvenile rats [11, 14, 26], it is therefore possible that the membrane depolarization caused by the transient elevation of extracellular KCl produces the formation of both LTP and LTD in young animals, thus resulting in no net modification of synaptic efficacy. Future experiments will evaluate the effect of varying conditions of KCl-mediated depolarization on synaptic efficacy during the developmental period.

In summary, our data are consistent with the view that changes in AMPA receptor properties are important components of synaptic plasticity. We also suggest that altered regulation of AMPA receptor properties by endogenous phospholipases could be a major factor in conditions characterized by LTP deficits.



## References

- [1] Aronica, E., Casabona, G., Genazzani, A. A., Catania, M. V., Contestabile, A., Virgili, M., & Nicoletti, F. (1992). Melittin enhances excitatory amino acid release and AMPA-stimulated  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx in cultured neurons. *Brain Research*, 586, 72-77.
- [2] Artola, A., & Singer, W. (1993). Long-term depression of excitatory synaptic transmission and its relationship to long-term potentiation. *Trends in Neuroscience*, 16, 480-487.
- [3] Baudry, M., Arst, D., Oliver, M., & Lynch, G. (1981). Development of glutamate binding sites and their regulation by calcium in rat hippocampus. *Brain Research*, 227, 37-48.
- [4] Baudry, M., Massicotte, G., & Hauge, S. (1991). Phosphatidylserine increases the affinity of the AMPA/quisqualate receptor in rat brain membranes. *Behav. Neural Biology*, 55, 137-140.
- [5] Bernard, J., Chabot, C., Gagné, J., Baudry, M., & Massicotte, G. (1995). Melittin increases AMPA receptor affinity in rat brain synaptoneurosomes. *Brain Research*, 671, 195-200.
- [6] Bernard, J., Lahsaini, A., Baudry, M., & Massicotte, G. (1993). The phospholipase A2 inhibitor bromophenacyl bromide prevents the depolarization-induced increase in [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding in rat brain synaptoneurosomes. *Brain Research*, 628, 340-344.
- [7] Bernard, J., Lahsaini, A., & Massicotte, G. (1994). Potassium-induced long-term potentiation in area CA<sub>1</sub> of the hippocampus involves phospholipase activation. *Hippocampus*, 4, 1-7.
- [8] Bernard, J., Massicotte, G. and Baudry, M., Potassium-induced depolarization of rat telencephalic synaptoneurosomes increases  $^3\text{H}$ -AMPA receptor binding, *J. Neurochem.*, 58 (1992) 387-389.
- [9] Collingridge, G. L., Kehl, S. J., & McLennan, H. (1983). Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *Journal. Physiol. London*, 334 (1983) 33-46.

- [10] Davies, S. N., Lester, R. A., Reymann, K. G., & Collingridge, G. L. (1989). Temporally distinct pre- and post-synaptic mechanisms maintain long-term potentiation. *Nature*, 338, 500-503.
- [11] Dudek, S. M., & Bear, M. F. (1993). Bidirectional long-term potentiation of synaptic effectiveness in the adult and immature hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 13, 2910-2918.
- [12] Dumuis, A., Sebben, M., Fagni, L., Prézeau, L., Manzoni, O., Cragoe, E. J., & Bockaert, J. (1993). Stimulation by glutamate receptors of arachidonic acid release depends on the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger in neuronal cells. *Molecular Pharmacology*, 43, 976-981.
- [13] Dumuis, A., Sebben, M., Haynes, L., Pin, J. P., & Bockaert, J. (1988). NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature*, 336, 69-70.
- [14] Fitzpatrick, J. S., & Baudry, M. (1994). Blockade of long-term depression in neonatal hippocampal slices by a phospholipase A2 inhibitor. *Developmental Brain Research*, 78, 81-86.
- [15] Fleck, M. W., Palmer, A. M., & Barrionuevo, G. (1992). Potassium-induced long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Brain Research*, 580, 100-105.
- [16] Harris, K. M., & Teyler, T. J. (1984). Developmental onset of long-term potentiation in area CA<sub>1</sub> of the rat hippocampus. *Journal of Physiology (London)*, 346, 27-48.
- [17] Hollingsworth, E. B., McNeal, E. T., Burton, J. L., Williams, R. J., Daly, J. W., & Creveling, C. R. (1985). Biochemical characterization of a filtered synaptoneurosone preparation from guinea-pig cerebral cortex: cyclic adenosine 3',5'-monophosphate generating systems, receptors, and enzymes. *Journal of Neuroscience*, 5, 2240-2253.
- [18] Isaac, J. T. R., Nicoll, R. A., & Malenka, R. C. (1995). Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron*, 15, 427-434.
- [19] Kauer, J. A., Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1988). A persistent postsynaptic modification mediates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuron*, 1, 911-917.
- [20] Lajtha, A. (1985). *Handbook of Neurochemistry*. New York : Plenum Press.

- [21] Larson, J., & Lynch, G. (1989). Role of *N*-methyl-D-aspartate receptors in the induction of synaptic potentiation by burst stimulation patterned after the hippocampal theta rhythm. *Brain Research*, 441, 111-118.
- [22] Lee, K., Oliver, M., Schottler, F., & Lynch, G. (1981). Electron microscopic studies of brain slices: the effects of high frequency stimulation on dendritic ultrastructure. In G. Kerkut & H. V. Wheal (Éds), *Electron microscopic studies of brain slices: the effects of high frequency stimulation on dendritic ultrastructure* (pp. 189-212). New York : Academic Press.
- [23] Liao, D., Hessler, N. A., & Malinow, R. (1995). Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature*, 375, 400-404.
- [24] Linden, D. J. (1994). Long-term depression in the mammalian brain. *Neuron*, 12, 457-472.
- [25] Lynch, G., Larson, J., Kelso, S., Barrionuevo, G., & Schottler, F. (1983). Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature*, 305, 20-26.
- [26] Malenka, R. (1994). Multiple forms of NMDA-dependent synaptic plasticity in the hippocampus. In M. Baudry and J. Davis (Éds.), *Multiple forms of NMDA-dependent synaptic plasticity in the hippocampus* (pp. 121-141). Cambridge : MIT Press.
- [27] Malenka, R. C., Kauer, J. A., Zucker, R. S., & Nicoll, R. A. (1988). Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission. *Science*, 242, 81-84.
- [28] Maren, S., Tocco, G., Standley, S., Baudry, M., & Thompson, R. F. (1992). Postsynaptic factors in the expression of long-term potentiation (LTP): increased glutamate receptor binding following LTP induction in vivo. *Proc. Nat. Acad. Science*, 90, 9654-9658.
- [29] Massicotte, G., & Baudry, M. (1990). Modulation of AMPA/Quisqualate receptors by phospholipase A2 treatment. *Neuroscience Lett.*, , 245-248.
- [30] Massicotte, G., & Baudry, M. (1991). Triggers and substrates of hippocampal synaptic plasticity. *Neuro. Biobehav. Review*, 15, 415-423.

- [31] Massicotte, G., Bernard, J., & Baudry, M. (1992). Postnatal changes in AMPA receptor regulation by phospholipase A2 treatment of synaptic membranes: temporally differential effects on agonist and antagonist binding. *Developmental Brain Research*, 66, 203-208.
- [32] Massicotte, G., Oliver, M. W., Lynch, G., & Baudry, M. (1990). Effect of bromophenacylbromide, a phospholipase A2 inhibitor, on the induction and maintenance of LTP in hippocampal slices. *Brain Research*, 537, 49-53.
- [33] Monyer, H., Seeburg, P. H., & Wisden, W. (1991). Glutamate-operated channels: developmentally early and mature forms arise by alternative splicing. *Neuron*, 6, 799-810.
- [34] Morris, R. G. M., Anderson, E., Lynch, G. S., & Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by the *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP-5. *Nature*, 319, 774-776.
- [35] Muller, D., Joly, M., & Lynch, G. (1988). Contributions of quisqualate and NMDA receptors to the induction and expression of LTP. *Science*, 242, 1694-1697.
- [36] Okada, D., Yamagishi, S., & Sugiyama, H. (1989). Differential effects of phospholipase inhibitors in long-term potentiation in the rat hippocampal mossy fiber synapses and Schaffer/commissural synapses. *Neuroscience Lett.*, 100, 141-146.
- [37] Pellegrini-Giampietro, D. E., Bennett, M. V. L., & Zukin, R. S. (1991). Differential expression of three glutamate receptor genes in developing rat brain: an in situ hybridization study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 4157-4161.
- [38] Standley, S., Irvin, N., & Baudry, M. (1994). Differential subcellular localization of two populations of glutamate/AMPA receptors in the rat telencephalon. *Neurochem. Int.*, 25, 287-293.
- [39] Standley, S., Tocco, G., Tourigny, M. F., Massicotte, G., Thompson, R. F., & Baudry, M. (1995). Developmental changes in amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptor properties and expression in the rat hippocampal formation. *Neuroscience*, (1995) (in press).
- [40] Staubli, U., Thibault, O., DiLorenzo, M., & Lynch, G. (1989). Antagonism of NMDA receptors impairs acquisition but not retention of olfactory memory. *Behav. Neuroscience*, 103, 54-60.

- [41] Tocco, G., Maren, S., Shors, T., Baudry, M., & Thompson, R. F. (1992). Long-term potentiation is associated with increased  $^3\text{H}$ -AMPA binding in rat hippocampus. *Brain Research*, 573, 228-234.
- [42] Verity, M. A., Sarafian, T., Pacifici, E. H. K., & Sevanian, A. (1994). Phospholipase A2 stimulation by methyl mercury in neuron culture. *Journal of Neurochemistry*, 62, 705-714.
- [43] Williams, J. H., & Bliss, T. V. (1989). An in vitro study of the effect of lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibitors of arachidonic acid on the induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *Neuroscience Lett.*, 107, 1-3.

## CONTEXTE THÉORIQUE

La période du développement constitue une belle opportunité pour déterminer le rôle des différents processus biochimiques dans le phénomène de dépression à long terme puisque ce dernier est plus facilement reproduit au cours de la période postnatale. Des études démontrent que le bromure de bromophénacyl, un inhibiteur de la phospholipase  $A_2$ , empêche le maintien du phénomène de potentialisation et de dépression à long terme (Baudry et al., 1992; Fitzpatrick et al., 1994; Normandin et al., 1996).

Ce paradoxe soulève une question importante. Comment une même enzyme peut-elle être impliquée dans deux phénomènes physiologiques totalement opposés? Le troisième manuscrit évalue les différents processus biochimiques sous-jacents à l'activation de la phospholipase  $A_2$ . Encore ici, la majorité des expériences et le projet ont été conçues par l'auteur.

**Bidirectional Modulation of AMPA Receptor Properties by exogenous  
phospholipase A<sub>2</sub> in the hippocampus**

Chantale Chabot<sup>1</sup>, Joël Gagné<sup>1</sup>, Caroline Giguère<sup>1</sup>, Julie Bernard<sup>1</sup>,  
Michel Baudry<sup>2</sup> and Guy Massicotte<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Département de Chimie-Biologie  
Université du Québec à Trois-Rivières  
C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

<sup>2</sup>Program in Neurosciences, University of Southern California  
Los Angeles, California, USA 90089-2520

<sup>3</sup>Centre de Recherche Philippe Pinel  
Montréal, Québec, Canada H1C 1H1

### Abstract

The synaptic modifications underlying long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) of synaptic transmission in various brain structures may result from changes in the properties of the  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) subtype of glutamate receptors. In the present study, we report that treatment of rat synaptoneurosomes with increasing concentrations of phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) produces a biphasic effect on AMPA receptor binding, with low concentrations causing a decrease and high concentrations an increase in agonist binding. Analysis of the saturation kinetics of <sup>3</sup>H-AMPA binding revealed that the biphasic effect of PLA<sub>2</sub> was due to modifications in receptor affinity and not to changes in the maximum number of binding sites for AMPA receptors. The 12-lipoxygenase inhibitors preferentially reduced PLA<sub>2</sub>-induced decrease in AMPA binding and treatment of hippocampal synaptoneurosomes with arachidonic acid (AA) or 12-HPETE, the first metabolite generated from the hydrolysis of AA by 12-lipoxygenases, decreased <sup>3</sup>H-AMPA binding. Moreover, electrophysiological experiments indicated that the 12-lipoxygenase inhibitor baicalein totally blocked LTD formation in area CA<sub>1</sub> of hippocampal slices. The decrease in <sup>3</sup>H-AMPA binding elicited by low concentrations of PLA<sub>2</sub>, as well as the level of LTD, were partially reduced by AA-861, a 5-lipoxygenase inhibitor, while the cyclooxygenase inhibitor indomethacin did not prevent LTD formation nor the effects of PLA<sub>2</sub> on <sup>3</sup>H-AMPA binding. Our results provide evidence for a possible involvement of



lipxygenase metabolites in the regulation of AMPA receptor during synaptic depression. In addition, they strongly support the idea that the same biochemical pathway, i.e., NMDA receptor activation and endogenous PLA<sub>2</sub> stimulation, may represent a common mechanism resulting in AMPA receptor alterations for both LTP and LTD formation.

## Introduction

Long-lasting changes in synaptic operation in response to various patterns of synaptic activation are thought to form the basis for the neuronal alterations that contribute to different forms of learning and memory. Long-term potentiation (LTP) is defined as a long-lasting enhancement of synaptic efficacy following brief trains of high-frequency bursts applied to afferent pathways, whereas long-term depression (LTD) of synaptic strength is generally evoked by long trains of low-frequency stimulation. It has been shown that some forms of LTP and LTD require sufficient dendritic depolarization to activate the NMDA (N-methyl-D aspartate) subtype of glutamate receptors and to produce calcium influx into postsynaptic structures, with the amplitude of the calcium signal being critical for the generation of either LTP or LTD [3].

The rise in calcium concentration mediated by NMDA receptor activation has been proposed to stimulate various calcium-dependent enzymatic processes: protein kinases, phosphatases, phospholipases, and proteases that could convert the induction signal into long-lasting changes in synaptic structure and AMPA receptor function [8]. Among these enzymes, protein kinases and phosphatases have so far been predominantly considered with regard to LTP and LTD formation. The levels of postsynaptic calcium influx achieved with different degrees of NMDA receptor activation during tetanic stimulation are thought to produce opposite changes in protein phosphorylation, with

high levels of calcium influx activating protein kinases and generating LTP while low calcium influx would activate protein phosphatases and lead to LTD [29, 44]. The phosphatases generally implicated in the formation of hippocampal LTD are the calcium-independent phosphatase 1 and the calcium/calmodulin-dependent phosphatase calcineurin [39, 40]. The role of protein kinases in synaptic plasticity was also confirmed by gene knockout experiments and it has been shown that  $\alpha$ CaM-KII or  $\gamma$ PKC genes are possibly important for LTP formation [1, 52], an idea consistent with the observations of increased protein kinase activities during LTP [2, 5]. Other studies using gene-targeting approaches have shown, however, that alterations in kinase activity in transgenic animals do not necessarily eliminate the formation of either LTP or LTD elicited by the appropriate tetanic stimulation [4, 29, 36]. Within this context, it has been hypothesized that several calcium-dependent enzymes are possibly involved in producing changes in synaptic efficacy [8].

Increasing evidence suggests that changes in synaptic function observed with LTP and LTD are the result of modifications of postsynaptic currents mediated by the AMPA subtype of glutamate receptors. For instance, recent studies have proposed that LTP expression may involve the uncovering of functional AMPA receptors that, prior to LTP, are either not present in postsynaptic membranes or are electrophysiologically silent [21, 26]. Several arguments have been advanced to support the hypothesis that activation of the calcium-dependent enzyme phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) may be part of the molecular

mechanisms involved in the appearance of new functional AMPA receptors in LTP [6, 15]. For instance, NMDA receptor activation was found to produce long-lasting enhancement of endogenous PLA<sub>2</sub> activity [23] and a number of PLA<sub>2</sub> inhibitors block LTP formation in the hippocampus [6]. Moreover, we previously found that treatment of synaptic membranes with calcium-dependent phospholipases results in increased <sup>3</sup>H-AMPA binding to AMPA receptors [34], an effect also observed following LTP induction in hippocampus [10, 30].

Paradoxically, stimulation of endogenous PLA<sub>2</sub> could also be an important mechanism for LTD formation in various brain structures. PLA<sub>2</sub> inhibitors were found to block LTD expression in area CA<sub>1</sub> of hippocampal slices [17, 43] and PLA<sub>2</sub> treatment of synaptic membranes was reported to reduce <sup>3</sup>H-AMPA binding in rat cortical membranes during the developmental period [35]. As PLA<sub>2</sub> inhibitors reduced the magnitude of both LTP and LTD, we hypothesized that PLA<sub>2</sub> activation could elicit either increased or decreased agonist binding for AMPA receptors, depending on its degree of activation, thereby participating in a bidirectional regulation of efficacy at glutamatergic synapses [43].

In the present paper, several questions were addressed to better understand the role of PLA<sub>2</sub> in AMPA receptor regulation and to elucidate the degree to which different enzymatic processes interact with PLA<sub>2</sub>-induced changes in receptor properties. In particular, do various levels of PLA<sub>2</sub> activity differentially modulate the binding properties of AMPA receptors in the hippocampus? What role(s), if any, do arachidonic acid metabolites have in the regulation of AMPA receptor properties after PLA<sub>2</sub> activation? What are the relationships between modulation of AMPA receptors by PLA<sub>2</sub> and LTP or LTD formation induced by tetanic stimulation? Finally, is the modulation of AMPA receptors by PLA<sub>2</sub> affected by changes in phosphorylation conditions?

## Materials and methods

### Synaptoneurosome preparation for binding assays

Hippocampal synaptoneurosomes were prepared as described previously [19] from male Sprague-Dawley rats (20-30 days old). After preparation, they were incubated at 32°C for 40 min with different concentrations of PLA<sub>2</sub> (from porcine pancreas), phospholipase C (PLC; from clostridium perfringens) or arachidonic acid (AA) in the absence or presence of various inhibitors. In some experiments, synaptoneurosomes were prepared and preincubated in normal medium containing various inhibitors and protein kinase activators. Normal medium consisted of (in mM): NaCl 125, KCl 5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, MgCl<sub>2</sub> 1.5, CaCl<sub>2</sub> 0.5, NaHCO<sub>3</sub> 26, glucose 10 and ascorbic acid 2. At the end of incubation, synaptoneurosomes were centrifuged at 20 000 x g for 15 min and supernatants were discarded. The pellets were resuspended in 100 mM Tris-acetate buffer (pH 7.4) containing 100 µM EGTA. They were washed twice by two cycles of centrifugation/resuspension under the same conditions, and the final membrane suspension was used for binding assays. <sup>3</sup>H-AMPA (spec. act. 53 Ci/mmol; NEN) and <sup>3</sup>H-CNQX (spec. act. 16.1 Ci/mmol; NEN) binding assays were performed as described previously [34] with non-specific binding defined as the amount of binding measured in the presence of 0.2 mM glutamate. <sup>3</sup>H-arachidonic acid (<sup>3</sup>H-AA) was used for the determination of phospholipase activity [54]. In brief, synaptoneurosomes were labeled

for 1h in normal medium containing 200 nM  $^3\text{H}$ -arachidonate. After  $^3\text{H}$  incorporation, they were washed three times and resuspended in 500  $\mu\text{l}$  of medium containing various concentrations of PLA<sub>2</sub>. Following incubation at 35°C for 45 min, 200  $\mu\text{l}$  of the supernatant were removed and transferred to a scintillation vial for radioactivity determination of  $^3\text{H}$ -AA release in both basal and PLA<sub>2</sub>-treated conditions. All assays were performed in triplicate.

#### Hippocampal slice preparation for electrophysiology

Experiments were performed on hippocampal slices [24] prepared from male Sprague-Dawley rats (20-25 days old). Transverse slices were maintained at 35°C in a medium containing (in mM) NaCl 124, KCl 5, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, MgCl<sub>2</sub> 1.5, CaCl<sub>2</sub> 2.5, NaHCO<sub>3</sub> 26 and glucose 10. They were exposed to a humidified atmosphere of 95% O<sub>2</sub>: 5% CO<sub>2</sub> and perfused continuously at a flow rate of 1 ml/min. In some experiments, baicalein, indomethacin and AA-861 were first dissolved in DMSO and diluted in medium to give a final concentration of 50  $\mu\text{M}$  in 0.2% DMSO; all control experiments were performed in medium containing 0.2% DMSO. After a 1-hr equilibration period, a glass recording electrode (1-5 M $\Omega$  ; filled with 2 M NaCl) was positioned in stratum radiatum of area CA<sub>1</sub> of hippocampus to record population excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) evoked by a bipolar electrode (twisted 60  $\mu\text{m}$  nichrome) activating

fibers of the Schaffer collateral system. Bipolar stimulating electrodes were placed in stratum radiatum of two independent pathways converging on common postsynaptic target cells. After a 20 min baseline period during which responses were recorded every 30 sec., high [10 bursts of four stimulation pulses at 100 Hz given at 200 ms intervals; theta burst stimulation (TBS)] or low- (900 pulses at 1 Hz) frequency stimulation (LFS) was applied, and responses were then elicited every 30 sec. As previously reported and in order to provide a robust level of LTD in young rats, we extended the duration of the stimulus from 0.1 to 0.2 ms during the period of LFS [43]. In all cases, the response to stimulation was quantified by calculating the initial slope of the resulting EPSP. For most statistical comparisons, ANOVA was followed by Scheffé posthoc analysis with conventional criteria of statistical significance:  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ .



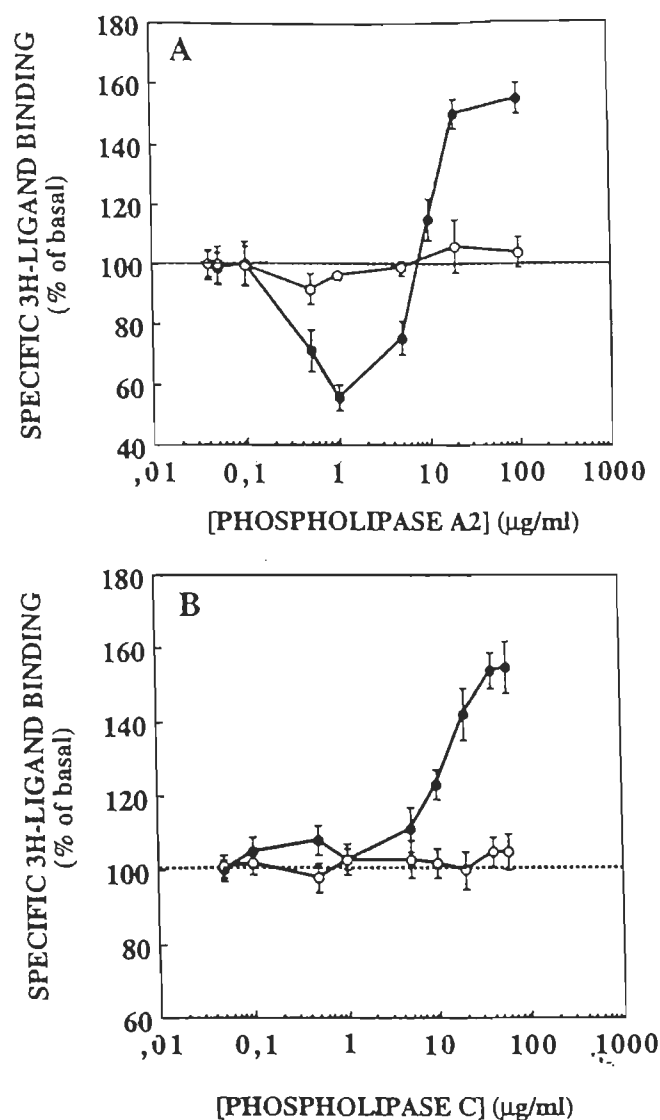
## Results

### Effects of PLA<sub>2</sub> treatment of hippocampal synaptoneurosomes on the binding properties of AMPA receptors.

We first determined the effects of incubating hippocampal synaptoneurosomes with different concentrations of PLA<sub>2</sub> on the binding properties of AMPA receptors. Bidirectional modifications in <sup>3</sup>H-AMPA binding were obtained by treatment of synaptoneurosomes with different concentrations of PLA<sub>2</sub>; low concentrations (0.1 - 8.0 µg/ml) caused a decrease and high concentrations (10.0 - 100.0 µg/ml) an increase in <sup>3</sup>H-AMPA binding. PLA<sub>2</sub>-induced changes in AMPA receptors were specific for the agonist, as binding of <sup>3</sup>H-CNQX, an AMPA receptor antagonist, was not modified by the same treatment (Fig. 1A). Saturation experiments at equilibrium were performed to determine whether the reduction (or the increase) in <sup>3</sup>H-AMPA binding produced by PLA<sub>2</sub> treatment was the result of changes in receptor affinity or in receptor numbers. At a concentration of 1.0 µg/ml of PLA<sub>2</sub>, the apparent affinity of <sup>3</sup>H-AMPA for the low-affinity component of the AMPA receptors was decreased by about 60% while the maximal number of sites was not significantly modified ( $K_d = 870 \pm 40$  nM and  $B_{max} = 17.5 \pm 1.5$  pmol/mg prot. in control membranes;  $K_d = 1395^* \pm 55$  nM and  $B_{max} = 18.3 \pm 1.3$  pmol/mg prot. in PLA<sub>2</sub>-treated synaptoneurosomes; means  $\pm$  S.E.M. of four experiments; \*  $P < 0.01$ , Student's *t*-test). The results obtained with a higher

concentration (15  $\mu\text{g/ml}$ ) of the enzyme indicated that PLA<sub>2</sub>-induced increase in <sup>3</sup>H-AMPA binding was also due to a change in receptor affinity for the low-affinity component of the AMPA receptors ( $K_d = 870 \pm 40$  nM in control vs.  $K_d = 568^* \pm 35$  nM in PLA<sub>2</sub>-treated synaptoneurosomes; means  $\pm$  S.E.M. of four experiments;  $*P < 0.01$ , Student's *t*-test), without significant alterations in maximal number of sites ( $B_{\text{max}} = 17.5 \pm 1.5$  in control vs.  $17.3 \pm 1.7$  pmol/mg of prot. in PLA<sub>2</sub>-treated synaptoneurosomes).

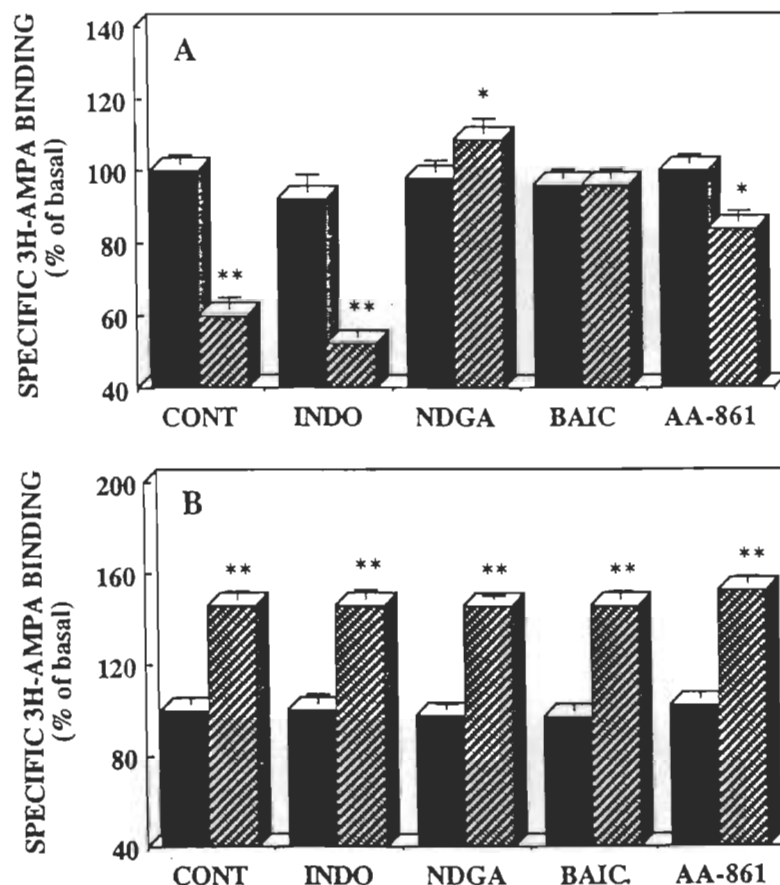
Since other phospholipases have been shown to modulate AMPA receptor binding (Massicotte et al., 1990a), we also determined the effects of PLC treatment of hippocampal synaptoneurosomes on <sup>3</sup>H-AMPA binding. In contrast to PLA<sub>2</sub>, treatment of synaptoneurosomes with PLC (from *Clostridium perfringens*) was only associated with increased <sup>3</sup>H-AMPA binding at high concentrations of the enzyme; again, no changes in <sup>3</sup>H-CNQX binding were observed at any concentrations of PLC tested (Fig. 1B).



*Figure 1.* Effect of exogenous phospholipases on  $^3\text{H}$ -AMPA binding in rat synaptoneurosomes. Synaptoneurosomes were prepared from the rat hippocampus and were preincubated at  $32^\circ\text{C}$  for 45 min in the absence or presence of various concentrations (0.01 to 100  $\mu\text{g/ml}$ ) of PLA<sub>2</sub> (A) and PLC (B). After preincubation of synaptoneurosomes, membrane suspensions were prepared and then processed for  $^3\text{H}$ -AMPA (closed circles) and  $^3\text{H}$ -CNQX (open circles) binding as described in Materials and Methods. The results are expressed as percent of basal binding from untreated synaptoneurosomes and are means  $\pm$  S.E.M. of seven experiments.

### Effects of Lipoxygenase Inhibition on PLA<sub>2</sub>-Induced Decrease in AMPA Binding in Hippocampal Synaptoneurosomes

PLA<sub>2</sub> is a family of enzymes that play a central role in the regulation of arachidonic acid (AA) release and production of various metabolites. In order to evaluate the possible participation of AA metabolites in PLA<sub>2</sub>-mediated changes in AMPA receptor binding, we determined the effects of several inhibitors on PLA<sub>2</sub>-induced decrease or increase in <sup>3</sup>H-AMPA binding elicited by a low concentration (1 µg/ml) or a high concentration (12 µg/ml) of PLA<sub>2</sub>, respectively. Synaptoneurosomes were preincubated with 100 µM indomethacin or 50 µM nordihydroguaiaretic acid (NDGA) in order to block the cyclooxygenase or the lipoxygenase pathways of AA metabolism. Indomethacin, which inhibits AA metabolism via the cyclooxygenase pathway, did not alter the PLA<sub>2</sub>-induced decrease or increase in <sup>3</sup>H-AMPA binding in hippocampal synaptoneurosomes, whereas the lipoxygenase inhibitor NDGA only affected the reduction in AMPA binding produced by a low concentration of the lipase (- 40 ± 4% in control vs. 10 ± 4% in NDGA-treated synaptoneurosomes) (Fig. 2); it should be remembered that, throughout the text, the results of binding experiments are expressed as the percentage change from control conditions.



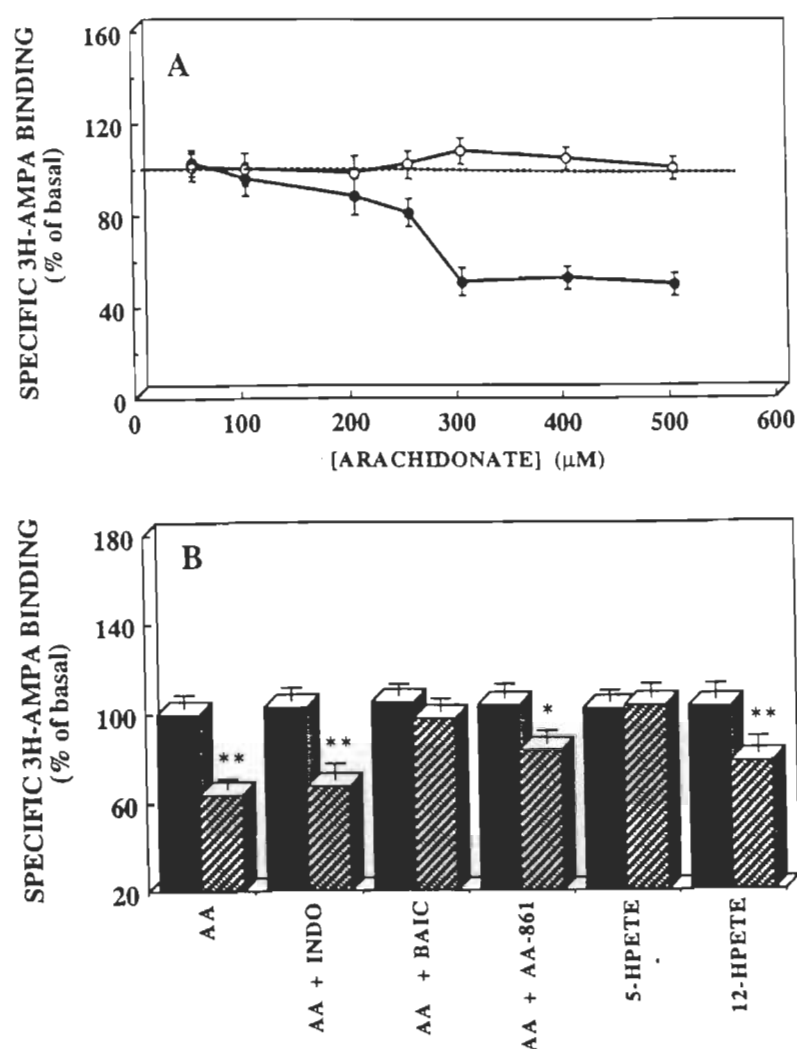
*Figure 2.* Effect of lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors on PLA<sub>2</sub>-induced changes in <sup>3</sup>H-AMPA binding in rat synaptoneurosomes. A: Synaptoneurosomes were prepared from rat hippocampus and were preincubated at 32°C for 45 min in the presence of various inhibitors without (closed bars; control) or with (hatched bars) a low concentration (1 µg/ml) of PLA<sub>2</sub>: indomethacin (100 µM: INDO), nordihydroguaiaretic acid (50 µM: NDGA), baicalein (50 µM: BAIC) and AA-861 (50 µM). After preincubation of the synaptoneurosomes, membrane suspensions were prepared and then processed for <sup>3</sup>H-AMPA binding as described in Materials and Methods. The results are expressed as percent of basal binding from untreated synaptoneurosomes and are means ± S.E.M. of seven experiments. ( $F[10, 69] = 17.3$ ;  $P < 0.001$ ), \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  (Scheffe's test); PLA<sub>2</sub>-treated vs. control. B: The effects of the inhibitors were also tested in the presence of a high concentration of PLA<sub>2</sub> (12 µg/ml). The results are expressed as percent of basal binding from untreated synaptoneurosomes and are means ± S.E.M. of seven experiments. ( $F[10, 69] = 31.7$ ;  $P < 0.001$ ), \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  (Scheffer's test); PLA<sub>2</sub>-treated vs. control.

We determined the effects of more specific lipoxygenase inhibitors on PLA<sub>2</sub>-mediated regulation of <sup>3</sup>H-AMPA binding in hippocampal synaptoneurosomes. PLA<sub>2</sub>-induced decrease in <sup>3</sup>H-AMPA binding elicited by low concentrations of the enzyme was significantly reduced by the 12-lipoxygenase inhibitor baicalein at a concentration of 50 μM (Fig. 2A); a similar effect was observed with cinnamyl-3,4-dihydroxy-α-cyanocinnamate (CDC; 50 μM), another 12-lipoxygenase inhibitor (- 43 ± 5% in control vs. -8 ± 6% in CDC-treated synaptoneurosomes). As shown in Figure 2A, the 5-lipoxygenase inhibitor AA-861 at 50 μM was partially effective in preventing the PLA<sub>2</sub>-induced decrease in <sup>3</sup>H-AMPA binding elicited by low concentrations of the enzyme. Again, both 12- and 5-lipoxygenase inhibitors did not alter PLA<sub>2</sub>-mediated up-regulation of AMPA receptor affinity at high concentrations of the enzyme (Fig. 2B).

#### Effects of Treatment of Hippocampal Synaptoneurosomes With Arachidonic Acid and Lipoxygenase Metabolites on the Binding Properties of AMPA Receptors

The above data suggested that PLA<sub>2</sub>-mediated biphasic modulation of AMPA receptor properties could be the result of two separate processes, with the reduction in <sup>3</sup>H-AMPA binding requiring the formation of lipoxygenase metabolites, and the enhancement in AMPA receptor binding being independent of metabolite production. Additional experiments were performed to provide more direct evidence that AA

metabolites were involved in the down-regulation of  $^3\text{H}$ -AMPA binding in hippocampal synaptoneurosomes. As with low concentrations of PLA<sub>2</sub>, treatment of hippocampal synaptoneurosomes with exogenous AA produced a concentration-dependent decrease in  $^3\text{H}$ -AMPA binding (Fig.3). The reduction in  $^3\text{H}$ -AMPA binding was observed in the range of 100-500  $\mu\text{M}$  and was maximal at a concentration of around 300  $\mu\text{M}$ ; at this concentration  $^3\text{H}$ -AMPA binding was decreased by nearly 50% (Fig. 3A). However, in contrast to synaptoneurosomes, treatment of purified synaptic membranes (Massicotte et al., 1990a) with AA did not modify  $^3\text{H}$ -AMPA binding, suggesting that AA does not down-regulate  $^3\text{H}$ -AMPA binding by directly interacting with AMPA receptors. We also determined the effects of several inhibitors on AA-induced decrease in  $^3\text{H}$ -AMPA binding on hippocampal synaptoneurosomes (Fig. 3B). Both AA-861 and baicalein were found to block the reduction in AMPA binding produced by exogenous AA. However, as with PLA<sub>2</sub>-induced reduction in AMPA binding, indomethacin did not prevent the effect of AA treatment on  $^3\text{H}$ -AMPA binding, which further indicate that the decrease in  $^3\text{H}$ -AMPA binding elicited by AA is likely due to the action of lipoxygenase products. In agreement with this idea, 2.0  $\mu\text{M}$  12-HPETE, a 12-lipoxygenase metabolite of AA, was found to decrease  $^3\text{H}$ -AMPA binding by 20%. In addition, a lack of effect of 5-HPETE on  $^3\text{H}$ -AMPA binding was observed, consistent with the observations that 12-lipoxygenase metabolites are preferentially involved in down-regulating AMPA receptor affinity (Fig. 3B).

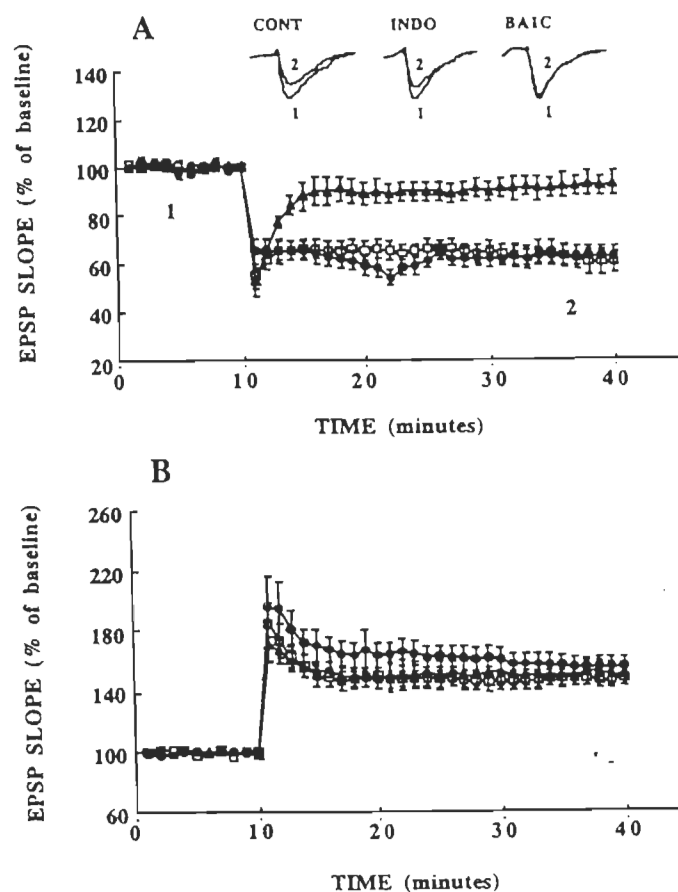


**Figure 3.** Effect of AA and HPETE by-products on  $^3\text{H}$ -AMPA binding in rat synaptoneurosomes. A: Synaptoneurosomes (closed circles) or purified synaptic membranes (open circles) were prepared from rat hippocampus and were preincubated at  $32^\circ\text{C}$  for 45 min in the absence or presence of the indicated concentrations of AA. B: Synaptoneurosomes were prepared from the hippocampus and were preincubated at  $32^\circ\text{C}$  for 45 min in the presence of various inhibitors without (closed bars; control) or with (hatched bars)  $250\ \mu\text{M}$  AA: indomethacin ( $100\ \mu\text{M}$ : INDO), baicalein ( $50\ \mu\text{M}$ : BAIC) and AA-861 ( $50\ \mu\text{M}$ ). HPETE-induced changes in AMPA receptor binding were also assessed in the absence of inhibitors. After preincubation of the synaptoneurosomes, membrane suspensions were prepared and then processed for  $^3\text{H}$ -AMPA binding as described in Materials and Methods. The results are expressed as percent of basal binding from untreated synaptoneurosomes and are means  $\pm$  S.E.M. of seven experiments. ( $F[12, 83] = 16.4$ ;  $P < 0.001$ ), \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  (Scheffe's test); treated vs. control.



### Effects of Cyclooxygenase and Lipoxygenase Inhibitors on LTD and LTP Formation in Rat Hippocampal Slices

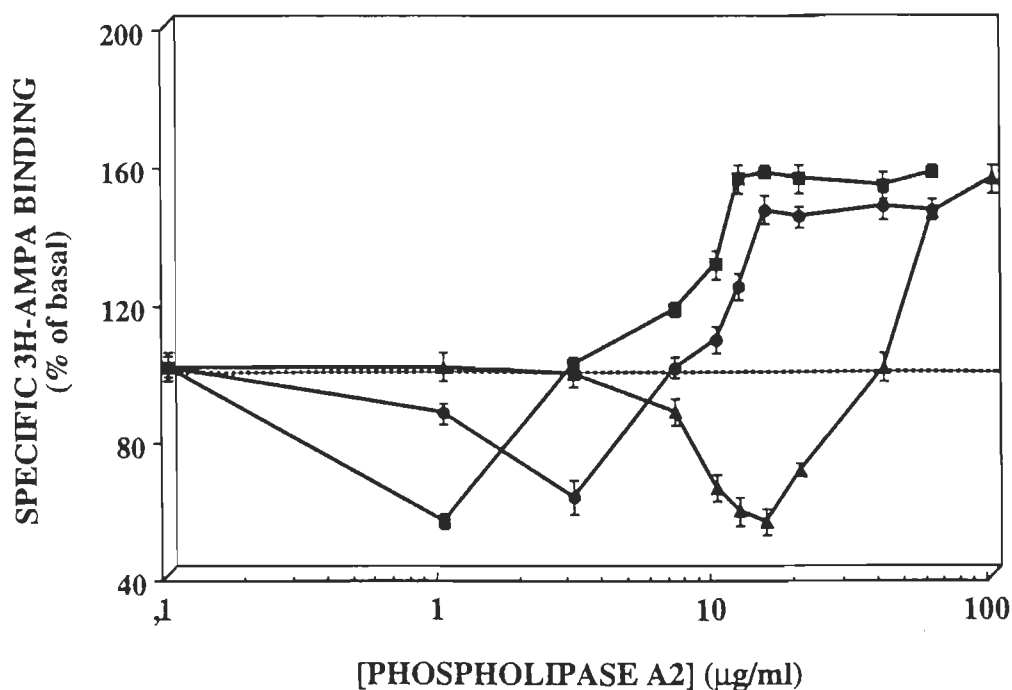
As the reduction in AMPA binding elicited by PLA<sub>2</sub> or AA treatment of rat synaptoneurosomes appeared to require lipoxygenase (but not cyclooxygenase) metabolites, we examined the effects of baicalein, AA-861 and indomethacin on LTD formation in hippocampal slices prepared from young rats (postnatal days 20-25) (see Fig. 4). The presence of baicalein, the 12-lipoxygenase inhibitor, in the perfusion medium significantly decreased the magnitude of LTD elicited by low-frequency stimulation (Fig. 4A). Addition of 50  $\mu$ M baicalein to the perfusion medium for 60 min prior to LFS markedly reduced the long-term effects of LFS ( $10 \pm 5\%$ ; Student *t*-test,  $P < 0.01$ ) when compared to control slices ( $37 \pm 5\%$ ,  $N = 7$ ). In agreement with the binding studies, the 5-lipoxygenase inhibitor AA-861 was partially effective in inhibiting LTD in young animals ( $22 \pm 4\%$ ,  $N = 7$ ; Student *t*-test,  $P < 0.05$ , data not show) whereas indomethacin did not affect the magnitude of hippocampal LTD ( $40 \pm 7\%$ ,  $N = 8$ ) (Fig. 4A). On the other hand, neither cyclooxygenase nor lipoxygenase inhibitors had significant effects on LTP magnitude elicited by theta burst stimulation in young rats (Fig. 4B).



*Figure 4.* Effect of lipoxigenase and cyclooxygenase inhibitors on LTD and LTP in area CA1 of the hippocampus. LTD (A) and LTP (B) were elicited by low (LFS)- and high-frequency stimulation (HFS), respectively. Field EPSPs were recorded in stratum radiatum of CA1 pyramidal cells in hippocampal slices before (open squares; control) or 1 h after perfusion with 50  $\mu$ M of the 12-lipoxigenase inhibitor baicalein (closed triangles) or with 100  $\mu$ M of the cyclooxygenase inhibitor indomethacin (closed circles). The initial slope of each EPSP was calculated and the values of four successive responses were averaged. The values obtained during the period preceding LFS or HFS were averaged to derive a baseline value. The data are expressed as percentages of baseline values. Each point represents the means  $\pm$  S.E.M. of nine different experiments. Records were taken before (1) and 30 min after (2) LFS.

Effects of Calcium and Protein Kinase Activators on PLA<sub>2</sub>-Induced Changes in AMPA Receptor Properties

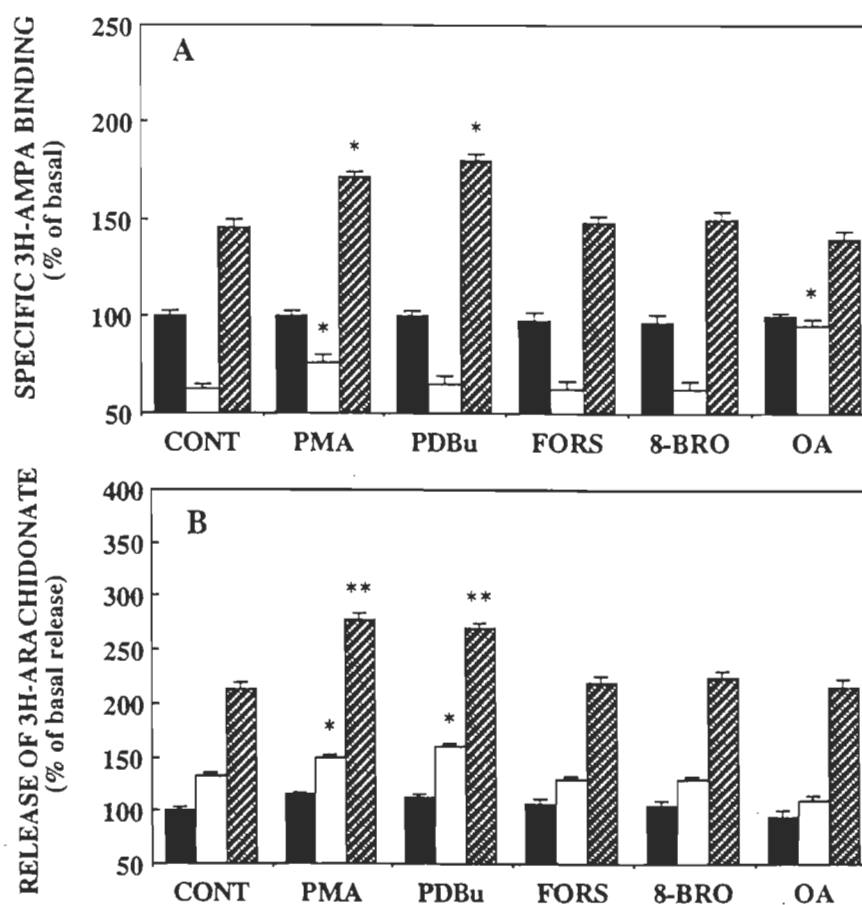
Influx of calcium through the NMDA subtype of glutamate receptor is widely accepted as a trigger for both LTD and LTP induction. The effects of increasing concentrations of PLA<sub>2</sub> on AMPA receptor binding were determined in the presence of various calcium concentrations (0.5, 2.0 and 5.0 mM) (Fig. 5). Changing calcium concentrations produced sliding curves to the left (high calcium concentrations) or to the right (low calcium concentrations) as compared to the curve obtained at intermediate concentration. However, no significant effects on the maximal decrease or increase in AMPA binding were observed at low or high calcium concentrations. As a result, the same concentration of PLA<sub>2</sub> could produce up- or down-regulation of <sup>3</sup>H-AMPA binding, depending on calcium concentration.



*Figure 5.* Effect of calcium on PLA<sub>2</sub>-induced changes in <sup>3</sup>H-AMPA binding in rat synaptoneurosomes. Synaptoneurosomes were prepared from rat hippocampus and were preincubated at 32°C for 45 min in the presence of various PLA<sub>2</sub> concentrations (0.01 - 100 μg/ml) and with 0.5 mM (closed triangles), 2.0 mM (closed circles) or 5.0 mM (closed squares) of calcium. After preincubation of the synaptoneurosomes, membrane suspensions were prepared and then processed for <sup>3</sup>H-AMPA binding as described in Materials and Methods. The results are expressed as percent of basal binding from untreated synaptoneurosomes and are means ± S.E.M. of seven experiments.

As calcium-dependent kinases and phosphatases provide intracellular processes for the expression of several forms of synaptic plasticity, we tested the effects of kinase activation and phosphatase inhibition on PLA<sub>2</sub>-mediated regulation of AMPA receptor binding (Fig. 6A). 8-bromo-cyclic AMP (8-BRO; 10 μM) and forskolin (FORS; 10 μM), which increase PKA activity, did not alter PLA<sub>2</sub>-induced decrease or increase in <sup>3</sup>H-

AMPA binding in hippocampal synaptoneurosomes, whereas the PKC activator PDBu (phorbol dibutyrate; 1.0  $\mu$ M) enhanced the increase in AMPA binding elicited by high concentrations of the lipase ( $190 \pm 3\%$  in PDBu-treated vs.  $150 \pm 4\%$  in control synaptoneurosomes). A similar result was observed in the presence of another PKC activator, PMA (phorbol 12-myristate, 13-acetate; 1  $\mu$ M). On the other hand, 4 $\alpha$ -phorbol (2.0  $\mu$ M) and 4 $\alpha$ -phorbol-12,13-didecanoate (4- $\alpha$ PDD; 2.0  $\mu$ M), two compounds inactive for stimulating PKC, did not alter PLA<sub>2</sub>-induced increase in <sup>3</sup>H-AMPA binding ( $47 \pm 7\%$  in 4 $\alpha$ -phorbol- and  $53 \pm 4\%$  in 4 $\alpha$ -PDD-treated vs.  $52 \pm 5\%$  in control synaptoneurosomes; n = 6).



**Figure 6.** Effect of phosphorylating agents on PLA<sub>2</sub>-induced changes in <sup>3</sup>H-AMPA binding and <sup>3</sup>H-arachidonate release in rat synaptoneurosomes. **A:** Synaptoneurosomes were prepared from rat hippocampus and were preincubated at 32°C for 45 min in the presence of various phosphorylating agents without (closed bars; control) or with 1 µg/ml (open bars) or 12 µg/ml (hatched bars) of PLA<sub>2</sub>: phorbol 12-myristate, 13-acetate (10 µM: PMA), phorbol-dibutyrate (10 µM: PDBu), forskolin (10 µM: FORS), 8-bromo-cyclic AMP (100 µM: 8-BRO), okadaic acid (10 µM: OA). After preincubation of the synaptoneurosomes, membrane suspensions were prepared and then processed for <sup>3</sup>H-AMPA binding as described in Materials and Methods. The results are expressed as percent of basal binding from untreated synaptoneurosomes and are means ± S.E.M. of seven experiments. ( $F[18, 126] = 91.1$ ;  $P < 0.0001$ ), \*  $P < 0.05$  (Scheffe's test) treated vs. control. **B:** Adult synaptoneurosomes were prepared and preincubated for 1 h in the presence of 200 nM <sup>3</sup>H-arachidonate, washed, and incubated at 32°C for 45 min in the absence or presence of 1 µg/ml (closed bars) or 12 µg/ml (hatched bars) of PLA<sub>2</sub>. Supernatants were collected by centrifugation and analyzed for <sup>3</sup>H-arachidonate release as described in Materials and Methods. The results are expressed as percent of basal AA release from untreated synaptoneurosomes and are means ± S.E.M. of five experiments. ( $F[18, 89] = 178$ ;  $P < 0.0001$ ), \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  (Scheffe's test) treated vs. control.

In contrast to PKC activators, preincubation of hippocampal synaptoneurosomes in the presence of the protein phosphatase inhibitor okadaic acid (OA; 10  $\mu$ M) did not significantly enhance PLA<sub>2</sub>-induced increase in <sup>3</sup>H-AMPA binding when compared to the controls, but resulted in a significant reduction in the effects of low concentrations of PLA<sub>2</sub> (- 6  $\pm$  5% in OA-treated vs. - 46  $\pm$  4% in control synaptoneurosomes) (Fig. 6A). Again, the inactive analogue of OA, OA<sub>7,10,24,28</sub>-tetraacetate at a concentration of 10  $\mu$ M, did not display any apparent actions on the PLA<sub>2</sub>-induced decrease or increase in <sup>3</sup>H-AMPA binding in hippocampal synaptoneurosomes (data not shown).

To determine the nature of the interactions between protein phosphorylation and PLA<sub>2</sub>-induced changes in AMPA binding, we evaluated the effects of kinase activators and phosphatase inhibitors on PLA<sub>2</sub> activity. Incubation of adult synaptoneurosomes for 1 h in the presence of <sup>3</sup>H-arachidonate resulted in a significant incorporation of AA in lipids (135  $\pm$  15  $\times 10^3$  dpm/mg of protein). Following extensive washing to eliminate unincorporated <sup>3</sup>H-AA, a slow basal rate of AA release was observed after 45 min of incubation of synaptoneurosomes at 35°C in the absence of PLA<sub>2</sub>, corresponding to about 2% of total <sup>3</sup>H-arachidonate incorporation. Incubation of synaptoneurosomes for the same period of time with exogenous PLA<sub>2</sub> produced a concentration-dependent stimulation of <sup>3</sup>H-AA release, and a significant effect was obtained at PLA<sub>2</sub> concentrations greater than 0.5  $\mu$ g/ml, with maximal enhancement reached at 15  $\mu$ g/ml.

Interestingly, PDBu and PMA, which enhanced PLA<sub>2</sub>-induced increase in <sup>3</sup>H-AMPA binding, also stimulated PLA<sub>2</sub>-mediated increase in <sup>3</sup>H-AA release; both protein kinase activators increased arachidonate release by about 60% in the presence of 12 µg/ml PLA<sub>2</sub> (Fig. 6B). In contrast, no significant differences in PLA<sub>2</sub>-mediated <sup>3</sup>H-AA release were observed in synaptoneurosomes preincubated in the presence of the PKA activators, 8-BRO and forskolin. When protein dephosphorylation was retarded by addition of the protein phosphatase inhibitor OA, <sup>3</sup>H-AA release was significantly reduced at low concentrations of the lipase, while no changes in this parameter were observed at high concentrations of PLA<sub>2</sub> (Fig. 6B). The present findings suggest that phosphorylation might be involved in the regulation of PLA<sub>2</sub> activity, and thereby in PLA<sub>2</sub>-induced changes in AMPA receptor affinity.



## Discussion

### Pharmacological Characterization of the Bidirectional Regulation of AMPA Receptors by PLA<sub>2</sub>

We previously showed that LTP was accompanied by an increase in AMPA receptor binding in the adult hippocampus [10, 30] and that PLA<sub>2</sub> treatment of adult synaptic membranes also resulted in an increase in affinity of AMPA receptors for the agonist [31, 34, 35]. In contrast, PLA<sub>2</sub> treatment of cortical membranes produced a decrease in agonist binding to AMPA receptors [35] at a developmental period characterized by a high degree of LTD expression in hippocampal slices [17]. Our previous observations that activation of endogenous PLA<sub>2</sub> might be critical for regulating AMPA receptor properties in both LTD and LTP have constituted strong evidence for a role of this enzymatic process in synaptic plasticity [10, 43, 49]. The present data support a molecular model in which the phospholipase A<sub>2</sub> pathway participates in a bidirectional control of AMPA receptor properties in rat hippocampus. The direction of the changes in AMPA receptors elicited by PLA<sub>2</sub> appears to be determined by distinct cellular processes associated with enzyme activation. Specifically, the reduction in AMPA binding at low concentrations of the lipase resulted from the accumulation of lipoxygenase metabolites of AA. In contrast and as previously reported [7, 11] PLA<sub>2</sub>-induced increase in AMPA receptor binding was not related to metabolite production and was possibly mediated by

other biochemical processes associated with PLA<sub>2</sub> activation, such as changes in lipid environment of the receptors. In this regard, we have shown previously that alterations of the lipid environment of synaptic membranes by phosphatidylserine (PS) incorporation up-regulated AMPA receptor affinity [7].

### Role of 12-Lipoxygenase AA Metabolites in Synaptic Depression

It has been reported that application of AA in hippocampal slices mimics LTD formation [13], while preincubation of hippocampal slices with PLA<sub>2</sub> inhibitors blocked LTD formation [33, 45]. AA metabolites produced via the 12-lipoxygenase pathway have been proposed to act as intracellular second messengers in invertebrate and vertebrate neurons [46]. Experimental evidence suggests that metabolites generated by 12-lipoxygenase pathways have various cellular effects such as hyperpolarization and increased postspike hyperpolarization [14] or inhibition of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II [47, 48], which are compatible with synaptic depression in hippocampus. In the present study, we established that generation of 12-lipoxygenase by-products might preferentially contribute to PLA<sub>2</sub>-induced reduction of AMPA receptor binding at low concentration of the enzyme in hippocampal synaptoneurosomes. Interestingly, a reduction in AMPA receptor function has been linked to maintenance of synaptic depression in area CA1 of the hippocampus [55] and we found in the present

study that LTD formation in area CA<sub>1</sub> of the hippocampus was decreased by the 12-lipoxygenase inhibitor baicalein.

From the binding experiments, we propose that the inhibition of LTD by baicalein is due to the inhibition of the down-regulation of AMPA receptor affinity by lipoxygenase metabolites. However, additional experimentation is required to support this conclusion; for instance, it remains to be established how 12-lipoxygenase inhibitors alter the changes in AMPA responses following LTD-inducing stimuli. Alternatively, 12-lipoxygenase inhibitors may produce side-effects which could have disrupted biochemical events underlying the induction of hippocampal LTD not necessarily linked to AMPA receptor regulation. In particular, previous studies have reported that AA potentiates synaptic responses mediated by the NMDA subtype of glutamate receptors [38], and it is conceivable that baicalein prevents LTD formation by reducing the activation of this subtype of glutamate receptors, which represents the initial trigger for LTD formation in area CA<sub>1</sub> of the hippocampus. However, as AA-induced potentiation of NMDA receptors was not due to the formation of AA metabolites [38], it is unlikely that the 12-lipoxygenase inhibitor baicalein decreased LTD formation by simply affecting NMDA receptor function.

### Relationship Between PLA<sub>2</sub>-Induced Changes in AMPA Receptor Affinity and Synaptic Plasticity

Our results did not provide direct evidence that PLA<sub>2</sub>-induced changes in AMPA receptor affinity are critical for controlling synaptic efficacy, since the effects we observed with exogenous PLA<sub>2</sub> may not necessarily reflect the true actions of endogenous PLA<sub>2</sub>. Nonetheless, there is increasing evidence suggesting that both LTP and LTD expression are mediated by a modification of postsynaptic currents elicited by the AMPA subtype of glutamate receptors [22, 41, 55]. Regarding synaptic potentiation, several studies have proposed that LTP expression may involve the uncovering of functional AMPA receptors that, prior to LTP, were either not present in postsynaptic membranes or electrophysiologically silent [21, 26]. This hypothesis, which assumes the appearance of a significant number of new functional non-NMDA receptors during synaptic potentiation, is consistent with previous observations indicating that LTP expression in the rat hippocampus is associated with selective increased binding of <sup>3</sup>H-AMPA to glutamate/AMPA receptors [10, 30, 53]. An increase in AMPA receptor affinity has been linked to enhanced synaptic transmission in area CA<sub>1</sub> of the hippocampus and reduced LTP formation, suggesting that alterations in receptor conformation by endogenous enzymes may be an important component of synaptic plasticity [18, 49]. It is of interest that modulation of AMPA receptors by endogenous PLA<sub>2</sub> is markedly reduced in very young animals and this effect would provide an

explanation for the observed reduction in LTP during development [15]. Accordingly, PLA<sub>2</sub>-induced increases in AMPA receptor affinity was also previously found to be reduced after the development of seizure activity in limbic circuits, another situation in which LTP is virtually absent [34].

The bidirectional regulation of synaptic function has been proposed to be mediated by a complex balance between phosphorylation and dephosphorylation reactions [29]. In particular, different observations have suggested that changes in phosphorylation of AMPA receptors produced by various kinases and phosphatases are involved in the regulation of synaptic efficacy [5, 37, 42] and previous studies have demonstrated that phosphorylation and dephosphorylation actions of protein kinase and phosphatase lead to differential regulation in the binding properties of AMPA receptors during the developmental period [51]. The levels of postsynaptic calcium influx achieved by different degrees of NMDA receptor activation during tetanic stimulation are thought to activate opposing changes in protein phosphorylation; high levels of calcium influx would activate preferentially protein kinases necessary for LTP while low calcium influx would activate protein phosphatases necessary for LTD [29]. Similarly, we found that the levels of calcium in synaptoneurosomes determined the direction of PLA<sub>2</sub>-mediated AMPA receptor modulation. In fact, the effects of increasing concentrations of PLA<sub>2</sub> on <sup>3</sup>H-AMPA binding and its modulation by calcium or kinase

activators are remarkably similar to the  $\phi$  function proposed by Cooper and Bear to describe changes in synaptic efficacy as a function of postsynaptic depolarization and to the sliding of the curve depending on prior synaptic activity [20].

The relationships between PLA<sub>2</sub> and protein kinases and phosphatases are not yet known. As AA metabolites generated by the 12-lipoxygenase pathway have been shown to alter kinase activity [46, 48], it remains possible that binding changes associated with PLA<sub>2</sub> activation are the results of the effects of 12-lipoxygenase metabolites on protein kinases. Alternatively, several findings support the possibility that protein kinases and phosphatases directly regulate PLA<sub>2</sub> activity. For instance, PKC has been reported to up-regulate PLA<sub>2</sub> activity in various tissues. PDGF, EGF, ATP and phorbol 12-tetradecanoate 13-acetate cause phosphorylation of the serine or threonine residues of PLA<sub>2</sub>, resulting in enhanced enzymatic activity [27]. As treatment of synaptoneuroosomes with PKC activators increased both PLA<sub>2</sub> activity and PLA<sub>2</sub>-mediated increase in AMPA binding, it is tempting to suggest that phosphorylation conditions are critical for determining the direction of PLA<sub>2</sub>-mediated changes in AMPA receptors. In particular, glutamate application stably enhanced the activity of cytosolic forms of PLA<sub>2</sub> in brain cortical cultures, an effect mediated by PKC stimulation [23]. Taken together, these data support the notion that phosphorylation could elicit changes in the ability of endogenous PLA<sub>2</sub> to modulate AMPA receptor properties.

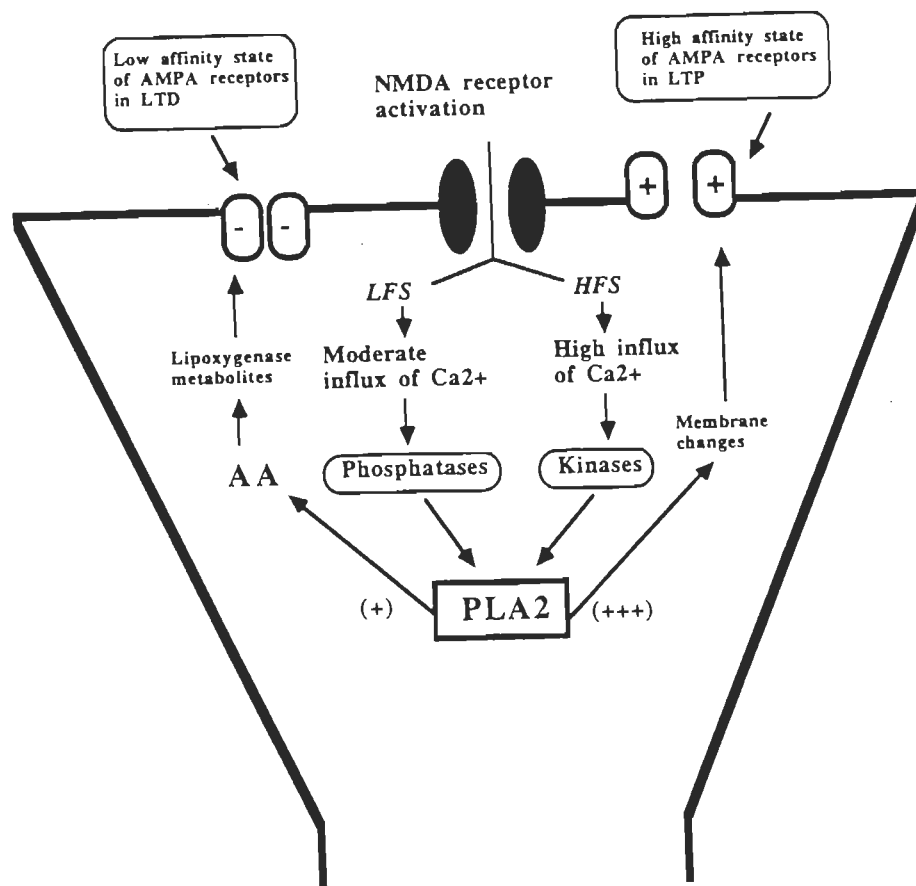
Lastly, based on results from experiments using phosphatase inhibitors, it has been proposed that dephosphorylation plays an essential role in LTD [29, 39, 40]. We compared the regulation of AMPA receptor properties by PLA<sub>2</sub> in the absence or presence of the phosphatase inhibitor OA. In contrast to protein kinase activators, OA slightly reduced PLA<sub>2</sub> activity, an effect associated with a loss in PLA<sub>2</sub>-mediated down regulation of AMPA receptor affinity. We have no obvious explanation for these apparently contradicting results obtained with kinase activators and a phosphatase inhibitor, which should have similar effects on phosphoproteins. However, it is interesting to mention that a reduction in PLA<sub>2</sub> activity has been associated with increased phosphorylation resulting from phosphatase inhibitors in blood platelets [16]. It is thus tempting to speculate that impairment of LTD in the presence of phosphatase inhibitors might be mediated by a reduction in PLA<sub>2</sub> activity. However, as phosphorylation of lipxygenases may influence their translocation and function [25], we cannot totally exclude the possibility that okadaic acid is also affecting the formation of lipxygenase metabolites during LTD. Further experiments would be important to either establish or reject a causal relationship between protein phosphatase activity and PLA<sub>2</sub>-induced changes in AMPA receptor properties in synaptic plasticity. Finally, it should be noted that some evidence exists for a presynaptic locus for the maintenance of LTP. In addition to its postsynaptic actions, activation of the AA cascade could increase glutamate release through a presynaptic interaction with metabotropic glutamate receptors, as well as inhibit the function of glutamate transporters [12]. We cannot yet

totally exclude possible actions of AA or its metabolites at the presynaptic level, which could involve changes in transmitter release during both LTD and LTP.



## Conclusion

Regardless of the precise mechanisms involved, our results provide evidence that protein kinases and phosphatases may be critical for regulating the degree of activation of PLA<sub>2</sub>, an enzyme we showed to provide a bidirectional modulation of AMPA receptor properties. A putative biochemical model that accounts for the bidirectional control of synaptic function by phosphorylation processes and PLA<sub>2</sub> activation is represented in Figure 7. We first postulate that a balance between kinase and phosphatase activity determines the level of PLA<sub>2</sub> activity. A rise in phosphatase activity would favor partial activation of PLA<sub>2</sub> and produce down-regulation of AMPA receptor affinity and LTD, while an enhancement of kinase activity would favor full activation of the lipase and result in up-regulation of AMPA receptors and LTP. The present study, using specific inhibitors of lipoxygenase pathways of AA metabolism, has shown that generation of 12-lipoxygenase metabolites is possibly crucial for reducing AMPA receptor function in hippocampal LTD. As LTD expression in the cerebellum appears also to be mediated by PLA<sub>2</sub> activation [28], it will be certainly important to determine whether the formation of lipoxygenase products is a common mechanism underlying synaptic depression in other brain regions.



*Figure 7.* A biochemical model integrating phosphorylation processes and PLA<sub>2</sub> activation for mediating LTD and LTP. During low-frequency stimulation (LFS) a moderate influx of calcium, mediated by NMDA receptor activation, causes an increase phosphatase activity which could partially activate PLA<sub>2</sub>. Then the lipase down-regulates AMPA receptor affinity by producing lipoxygenase products of AA, resulting in LTD. During high-frequency stimulation (HFS), a large amount of calcium preferentially stimulates protein kinases which now fully activate PLA<sub>2</sub>. The enzyme up-regulates AMPA receptor affinity by changing the lipid environment of the AMPA receptors, thereby producing LTP. The calcium-dependent protease calpain may also be involved in mediating AMPA receptor changes in LTP (Baudry and Massicotte 1992).

## References

- [1] Abeliovich A., Chen C., Goda Y., Silva A. J., Stevens C. F., Tonegawa S. Modified hippocampal long-term potentiation in PKC $\gamma$ -mutant mice. *Cell* 1993; 75: 1252-1262.
- [2] Akers, R. F., Lovinger, D. M., Colley, P. A., Linden, D. J., & Routtenberg, A. (1986). Translocation of protein kinase C activity may mediate hippocampal long-term potentiation. *Science*, 231, 587-589.
- [3] Artola, A., Broecker, S., & Singer, W. (1990). Different voltage-dependent thresholds for inducing long-term depression and long-term potentiation in slices of rat visual cortex. *Nature*, 347, 69-72.
- [4] Bach, M. E., Hawkins, R. D., Osman, M., Kandel, E. R., & Mayford, M. (1995). Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal LTP in the range of the theta frequency. *Cell*, 81, 905-915.
- [5] Barria, A., Muller, D., Derkach, V., Griffith, L. C., & Soderling, T. R. (1997). Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science*, 276, 2042-2045.
- [6] Baudry, M., & Massicotte, G. (1992). Physiological and pharmacological relationships between long-term potentiation and mammalian memory. *Concepts in Neuroscience*, 3, 79-98.
- [7] Baudry, M., Massicotte, G., & Hauge, S. (1991). Phosphatidylserine increases the affinity of the AMPA/Quisqualate receptor in rat brain membranes. *Behavior in Neural Biology*, 55, 137-140.
- [8] Baudry, M., Thompson, R. F., & Davis, J. L. Synaptic plasticity: molecular, cellular and functional aspects. Cambridge : MIT Press.
- [9] Bear, M.F. (1995). Mechanism for a sliding synaptic modification threshold. *Neuron*, 15, 1-4.
- [10] Bernard, J., Lahsaini, A., Massicotte, G. (1994). Potassium-induced long-term potentiation in area CA1 of the hippocampus involves phospholipase activation. *Hippocampus*, 4, 447-453.

- [11] Bernard, J., Chabot, C., Gagné, J., Baudry, M., & Massicotte, G. (1995). Melittin increases AMPA receptor affinity in rat brain synaptoneuroosomes. *Brain Research*, 671, 195-200.
- [12] Bliss, T. V., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361, 31-39.
- [13] Bolshakov, V. Y., & Siegelbaum, S. A. (1995). Hippocampal long-term depression: arachidonic acid as a potential retrograde messenger. *Neuropharmacology*, 34, 1581-1587.
- [14] Carlen, P. L., Gurevich, N., Wu, P. H., Su, W. G., Corey, E. J., & Pace-Asciak, C. R. (1989). Actions of arachidonic acid and heptoxilin A3 on mammalian hippocampal CA1 neurons. *Brain Research*, 497, 171-176.
- [15] Chabot, C., Bernard, J., Normandin, M., Ohayon, M., Baudry, M., & Massicotte, G. (1996). Developmental changes in depolarization-mediated AMPA receptor modifications and potassium-induced long-term potentiation. *Developmental Brain Research*, 93, 70-75.
- [16] Chiang, T. M. (1993). The role of protein phosphatase 1 and 2A in collagen-platelet interaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 302, 56-63.
- [17] Fitzpatrick, J. S., & Baudry, M. (1994). Blockade of long-term depression in neonatal hippocampal slices by a phospholipase A2 inhibitor. *Developmental Brain Research*, 78, 81-86.
- [18] Foster, T. C., Gagné, J., & Massicotte, G. (1996). Mechanism of altered synaptic strength due to experience: relation to long-term potentiation. *Brain Research*, 736, 243-250.
- [19] Hollingsworth, E. B., McNeal, E. T., Burton, J. L., Williams, R. J., Daly, J. W., & Creveling, C. R. (1985). Biochemical characterization of a filtered synaptoneurosome preparation from guinea-pig cerebral cortex: cyclic adenosine 3',5'-monophosphate generating systems, receptors, and enzymes. *Journal of Neuroscience*, 5, 2240-2253.
- [20] Intrator, N., Bear, M. F., Cooper, L. N., & Paradiso, M. (1993). Theory of synaptic plasticity in visual cortex. In: Baudry M, Thompson RF, Davis JL, (Eds) (pp. 147-168). *Synaptic Plasticity; Molecular, Cellular, and Functional Aspects*. Cambridge, MA: MIT Press.

- [21] Isaac, J. T. R., Nicoll, R. A., & Malenka, R. C. (1995). Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron*, 15, 427-434.
- [22] Kauer, J. A., Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1988). A persistent postsynaptic modification mediates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuron*, 1, 911-917.
- [23] Kim, D. Y., Rordorf, G., Nemenoff, R. A., Koroshetz, W. J., & Bonventre, J. V. (1995). Glutamate stably enhances the activity of two cytosolic forms of phospholipase A2 in brain cortical cultures. *Biochemical Journal*, 310, 83-90.
- [24] Lee, K., Oliver, M., Schottler, F., & Lynch, G. (1981). Electron microscopic studies of brain slices: the effects of high frequency stimulation on dendritic ultrastructure. In: Kerkut G, Wheal HV, (Éds) (pp. 189-212). Electrical activity in isolated mammalian CNS preparations. New York: Academic Press.
- [25] Lepley, R. A., Muskardin, D. T., & Fitzpatrick, F. A. (1996). Tyrosine kinase activity modulates catalysis and translocation of cellular 5-lipoxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 6179-6184.
- [26] Liao, D., Hessler, N. A., & Malinow, R. (1995). Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature*, 375, 400-404.
- [27] Lin, L. I., Lin, A. Y., & Knopf, J. L. (1992). Cytosolic phospholipase A2 is coupled to hormonally regulated release of arachidonic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 6147-6151.
- [28] Linden, D. J. (1995). Phospholipase A2 controls the induction of short-term versus long-term depression in the cerebellar Purkinje neuron in culture. *Neuron*, 15, 1393-1401.
- [29] Malenka, R. C. (1995). Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell*, 578, 535-538.
- [30] Maren, S., Tocco, G., Standley, S., Baudry, M., & Thompson, R. F. (1993). Postsynaptic factors in the expression of long-term potentiation (LTP): increased glutamate receptor binding following LTP induction in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 9654-9658.
- [31] Massicotte, G., & Baudry, M. (1990). Modulation of AMPA/Quisqualate receptors by phospholipase A2 treatment. *Neuroscience Letters*, 118, 245-248.

- [32] Massicotte, G., Kessler, M., Lynch, G., & Baudry, M. (1990a). N-methyl-D-aspartate and quisqualate/AMPA receptors: differential regulation by phospholipase C treatment. *Molecular Pharmacology*, 32, 278-85.
- [33] Massicotte, G., Oliver, M. W., Lynch, G., & Baudry, M. (1990b). Effect of bromophenacylbromide, a phospholipase A2 inhibitor, on the induction and maintenance of LTP in hippocampal slices. *Brain Research*, 537, 49-53.
- [34] Massicotte, G., Vanderklish, P., Lynch, G., & Baudry, M. (1991). Modulation of AMPA/quisqualate receptors by phospholipase A2: a necessary step in long-term potentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 1893-1897.
- [35] Massicotte, G., Bernard, J., & Baudry, M. (1992). Postnatal changes in AMPA receptor regulation by phospholipase A2 treatment of synaptic membranes: temporally differential affects on agonist and antagonist binding. *Developmental Brain Research*, 66, 203-208.
- [36] Mayford, M., Wang, J., Kandel, E. R., & O'Dell, T. J. (1995). CaMKII regulates the frequency-response function of hippocampal synapses for the production of both LTD and LTP. *Cell*, 81, 891-904.
- [37] McGlade-McCulloh, E., Yamamoto, H., Tan, S. E., Bricjey, D. A., & Soderling, T. R. (1993). Phosphorylation and regulation of glutamate receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Nature*, 362, 640-642.
- [38] Miller, B., Sarantis, M., Traynelis, S. F., & Attwell, D. (1992). Potentiation of NMDA receptor currents by arachidonic acid. *Nature*, 355, 722-725.
- [39] Mulkey, R. M., Endo, S., Shenolikar, S. S., & Malenka, R. C. (1994). Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature*, 486-488.
- [40] Mulkey, R. M., Herron, C. E., & Malenka, R.C. (1993). An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. *Science*, 261, 1051-1055.
- [41] Muller, D., Joly, M., & Lynch, G. (1988). Contributions of quisqualate and NMDA receptors to the induction and expression of LTP. *Science*, 242, 1694-1697.
- [42] Nakazawa, K., Mikawa, S., Hashikawa, T., & Ito, M. (1995). Transient and persistent phosphorylation of AMPA-type glutamate receptor subunits in cerebellar purkinje cells. *Neuron*, 15, 697-709.

- [43] Normandin, M., Gagné, J., Bernard, J., Élie, R., Miceli, D., Baudry, M., & Massicotte, G. (1996). Involvement of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in homosynaptic long-term depression of the rat hippocampus. *Brain Research*, 730, 40-46.
- [44] O'Dell, T. J., & Kandel, E. R. (1994). Low-frequency stimulation erases LTP through an NMDA receptor-mediated activation of protein phosphatases. *Learning and Memory*, 1, 129-139.
- [45] Okada, D., Yamagishi, S., & Sugiyama, H. (1989). Differential effects of phospholipase inhibitors in long-term potentiation in the rat hippocampal mossy fiber synapses and Schaffer/commissural synapses. *Neuroscience Letters*, 100, 141-146.
- [46] Piomelli, D., & Greengard, P. (1990). Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in neuronal transmembrane signalling. *Trends in Pharmacological Sciences*, 11, 367-373.
- [47] Piomelli, D., & Greengard, P. (1991). Bidirectional control of phospholipase A2 activity by  $\text{Ca}^{++}$ /calmodulin-dependent protein kinase II, cAMP-dependent protein kinase, and casein kinase II. *Proceedings in National Academy of Sciences*, 88, 6770-6774.
- [48] Piomelli, D., Wang, J. K., Sihra, T. S., Nairn, A. C., Czernik, A. J., & Greengard, P. (1989). Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II by arachidonic acid and its metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 8550-8554.
- [49] Shahi, K., & Baudry, M. (1993). Increasing binding affinity of agonists to glutamate receptors increases synaptic responses at glutamatergic synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 6881-6885.
- [50] Shahi, K., & Baudry, M. (1993). Glycine-induced changes in synaptic efficacy in hippocampal slices involve changes in AMPA receptors. *Brain Research*, 627, 261-266.
- [51] Shaw, C., & Lanius, R. A. (1992). Cortical AMPA receptors: age-dependent regulation by cellular depolarization and agonist stimulation. *Developmental Brain Research*, 68, 225-231.
- [52] Silva, A. J., Stevens, C. F., Tonegawa, S., & Wang, Y. (1992). Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin Kinase II mutant mice. *Science*, 257, 201-206.



- [53] Tocco, G., Maren, S., Shors, T., Baudry, M., & Thompson, R. F. (1992). Long-term potentiation is associated with increased 3H-AMPA binding in rat hippocampus. *Brain Research*, 573, 228-234.
- [54] Verity, M. A., Sarafian, T., Pacifici, E. H. K., & Sevanian, A. (1994). Phospholipase A2 stimulation by methyl mercury in neuron culture. *Journal of Neurochemistry*, 62, 705-714.
- [55] Vickery, R. M., & Bindman, L. J. (1997). Long-lasting decreases of AMPA responses following postsynaptic activity in single hippocampal neurons. *Synapse*, 25, 103-106.



## Chapitre 4

### Discussion générale

Selon le modèle élémentaire de plasticité neuronale présenté par Hebb (1949), il serait possible, en modifiant l'efficacité de la connexion entre les neurones, de favoriser tant l'emmagasinement que le retrait de l'information dans le cerveau. Il fut démontré à cet égard, que les processus de plasticité neuronale peuvent se traduire, à l'échelle de la synapse, par une augmentation (ou une diminution) de l'efficacité à transmettre l'influx nerveux. Par exemple, plusieurs études ont mis en valeur le rôle de la potentialisation à long terme comme processus synaptique de plasticité neuronale au cours de la mémorisation (Shors et al., 1997). Le neurotransmetteur mis en cause dans ce phénomène de plasticité neuronale est le glutamate qui, rappelons-le, agit principalement par l'intermédiaire de récepteurs ionotropiques de type NMDA et AMPA. Il faut évidemment souligner le rôle crucial des ions calcium dans l'apparition de la LTP, notamment dans la région CA<sub>1</sub> de l'hippocampe (Artola, Broecher et Singer, 1990; Lynch et al., 1983). En effet, dans la structure postsynaptique des neurones pyramidaux de cette région du cerveau, une hausse transitoire de calcium, résultant de l'activation des récepteurs NMDA, a pour conséquence d'activer divers processus enzymatiques tels les protéines kinases, les

phospholipases et les protéases, lesquels sont essentiels à l'induction de la LTP (Baudry et Massicotte, 1992) .

Or, puisque le maintien de la LTP semble dépendre de changements spécifiques des réponses assurées par les récepteurs AMPA, nous nous sommes intéressés, dans le cadre de ce travail, aux mécanismes *endogènes* susceptibles de réguler les caractéristiques de liaison des récepteurs AMPA, notamment à la phospholipase  $A_2$ . Notre intérêt en regard de ce système enzymatique découle principalement des études montrant que des inhibiteurs de cette enzyme dépendante du calcium bloquent la LTP hippocampale (Massicotte et al., 1990; Okada et al., 1989) et que l'application sur des préparations membranaires de phospholipases exogènes ( $PLA_2$  et PLC) modifie la liaison d'agoniste radioactif aux récepteurs AMPA (Cruickshank et Henley, 1994; Dev, Honore et Henley, 1998; Massicotte et al., 1990, 1991) .

### **$PLA_2$ endogène et régulation des récepteurs AMPA**

Dans une première série d'études, nous avons mis en évidence que l'ajout, à une préparation de synapses en suspension (ou synaptoneurosomes), d'un puissant activateur de la  $PLA_2$  endogène, la mellétine, engendre une hausse importante de l'affinité du récepteur AMPA. Ces résultats à caractère biochimique sont bien sûr à corrélérer avec ceux obtenus par Aronica et son groupe (1992) démontrant que les réponses assurées par les récepteurs AMPA et ce, en regard de leur perméabilité ionique, sont accrues suite à

l'action de la mellétine. Évidemment, la mellétine est loin d'être un composé spécifique à l'activation de la  $PLA_2$ . En effet, c'est une substance aussi reconnue pour ses effets inhibiteurs de la protéine kinase C et elle peut, par son insertion dans les membranes cellulaires, modifier les aspects biophysiques de ces dernières, notamment en ce qui a trait à la dynamique calcique (Fletcher et Jiang, 1993). Toutefois, nous avons démontré dans le cadre de la présente étude, que l'action de la mellétine sur les récepteurs AMPA est bloquée par le bromure de bromophénacyl, un inhibiteur de  $PLA_2$ , tandis que nos expériences effectuées sur des membranes neuronales purifiées indiquent que l'augmentation de l'affinité du récepteur AMPA ne résulte pas de l'action directe de la mellétine à l'échelle du compartiment membranaire. Par conséquent, les résultats obtenus dans le cadre de cette première série d'études laissent entrevoir que la modulation des récepteurs AMPA par la mellétine serait le résultat d'une action de la  $PLA_2$  endogène.

Les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la modulation à la hausse de l'affinité des récepteurs AMPA par la  $PLA_2$  endogène restent bien sûr à préciser. Pour Massicotte et ses collaborateurs (1991), ce serait le débalancement de l'environnement lipidique du récepteur par la  $PLA_2$  qui induirait cette hausse de liaison au récepteur AMPA. En effet, il a été démontré que la phosphatidylsérine, un phospholipide chargé négativement, peut de manière sélective accentuer l'affinité du récepteur AMPA dans la région hippocampale (Baudry et al., 1991; Gagné et al., 1996; Massicotte et al., 1991). Il faut savoir que la phosphatidylsérine se localise principalement à la face interne de la membrane cellulaire et ce, en raison de son interaction avec une protéine

périphérique à la membrane, la spectrine (Comfurius, Bevers et Zwaal, 1989; Comfurius, Senden, Tilly, Schroit, Bevers et Zwaal, 1990; Zwaal et al., 1989). Cette interaction de la phosphatidylsérine avec la spectrine peut toutefois se voir altérée lors de l'activation de la calpaine (une enzyme protéolytique) favorisant ainsi le passage de la phosphatidylsérine à la surface externe de la membrane cellulaire (processus dit de flip-flop). D'un point de vue physiologique, le processus de flip-flop s'avère crucial lors de la réorganisation membranaire, notamment au cours de l'agrégation plaquettaire (Comfurius et al., 1989; Zwaal et al., 1989). Puisque que l'activation de la calpaine semble impliquée lors de la formation de la LTP dans la région hippocampale (del Cerro et al., 1990; Oliver, Baudry et Lynch, 1989), il est probable que le processus de flip-flop puisse aussi contribuer aux changements lipidiques de la membrane et, conséquemment, des récepteurs AMPA au cours de la plasticité neuronale.

Par ailleurs, l'accumulation d'informations sur les structures et propriétés des PLA<sub>2</sub> laisse entrevoir que leurs rôles pourraient être des plus diversifiés. Non seulement peuvent-elles contribuer à la biosynthèse des eicosanoïdes et être impliquées dans la régulation des récepteurs AMPA, mais elles pourraient aussi se voir impliquées dans les processus de fusion membranaire, notamment lors de la phagocytose (Jacob, 1997). Bien que les mécanismes de fusion membranaire ne soient pas encore totalement élucidés, il a été démontré que la présence d'une PLA<sub>2</sub> ou l'un de ses principaux produits d'hydrolyse (l'acide arachidonique ou le lysophospholipide) induirait, ou du moins faciliterait, la fusion membranaire entre deux populations différentes de vésicules lipidiques (Lavoie, Jolicoeur et Paiement, 1991; Morin, Langlais et Lambert, 1992). Fait intéressant, des études récentes ont démontré que le récepteur AMPA est sujet à un processus de recyclage

complexe, dans lequel interviennent évidemment diverses protéines de fusion membranaire (Dingledine, Borges, Bowie et Traynelis, 1999). Dans un même ordre d'idée, Lledo et ses collaborateurs (1998) ont récemment montré que des phénomènes de fusion membranaire sont requis pour l'expression de la LTP et il est certainement possible de penser que la PLA<sub>2</sub> puisse être impliquée dans ces événements cellulaires.

Indépendamment des mécanismes en causes, nos données sont évidemment en faveur de l'hypothèse voulant que la PLA<sub>2</sub> endogène contribue à moduler la conformation des récepteurs AMPA. Or, plusieurs études *in vitro* ont démontré que la formation de la LTP dans la région hippocampale est liée à une hausse de la liaison du <sup>3</sup>H-AMPA à son récepteur (Maren, Tocco, Standley, Baudry et Thompson, 1993; Tocco et al., 1992). De plus, Bernard et ses collaborateurs (1995) ont démontré que la LTP résultant de la dépolarisation chimique par le KCl est associée à une hausse de l'affinité du récepteur AMPA dans les membranes de l'hippocampe, un effet qui se voit bloqué par les inhibiteurs de la PLA<sub>2</sub>. D'un point de vue comportemental, l'équipe de Foster (1996) a montré, par des expériences d'autoradiographie quantitative, que l'augmentation de l'efficacité des synapses glutamatergiques chez les animaux dits enrichis, est associée à une hausse de la liaison de l'agoniste <sup>3</sup>H-AMPA dans les diverses régions de l'hippocampe. L'enrichissement cognitif est le résultat d'un hébergement où l'animal se voit confronté à des stimulations visuelles et motrices permanentes, lesquelles accentuent considérablement la capacité de l'animal à effectuer certains apprentissages, en particulier pour ceux nécessitant une reconnaissance de l'environnement visuo-spatial (Moser, Trommaid et Andersen, 1994). Par ailleurs, l'animal enrichi se voit capable de générer une LTP endogène qui s'apparente à celle induite électriquement (Foster et al., 1996) et les

changements du récepteur AMPA dans cette condition résultent fort probablement d'une altération des composantes lipidiques de la membrane neuronale, compte tenu du fait que la capacité de la phosphatidylsérine à moduler les récepteurs AMPA est substantiellement réduite chez les animaux préalablement enrichis (Gagné et al., 1998). Certes, il sera important de vérifier si l'activation de la PLA<sub>2</sub> endogène constitue effectivement l'un des mécanismes susceptibles de contribuer à la modulation des récepteurs AMPA lors de l'enrichissement cognitif et il sera particulièrement intéressant de mesurer l'activité de la PLA<sub>2</sub> dans les neurones hippocampiques d'animaux enrichis.

### **Régulation des récepteurs AMPA lors de la période postnatale**

L'idée qu'une PLA<sub>2</sub> présente dans les cellules nerveuses puisse être impliquée dans la production de la LTP apparaît donc particulièrement séduisante. Cette hypothèse semble d'autant plus intéressante que l'intervention de la PLA<sub>2</sub> pourrait être requise pour la modulation des récepteurs AMPA lors du maintien de la LTP. Par ailleurs, de nombreux auteurs ont mis en lumière la présence d'un profil développemental spécifique à la LTP, en ce sens qu'elle apparaît de manière graduelle au cours des dix premiers jours de la période postnatale (Baudry et al., 1981; Harris et al., 1984). Nous avons évidemment pris avantage de cette situation physiologique unique pour vérifier l'importance de la PLA<sub>2</sub> comme mécanisme cellulaire de la plasticité neuronale. Les résultats obtenus dans le cadre de nos études chez le raton démontrent une relation étroite entre la capacité des neurones glutamatergiques à produire la LTP et le degré de modulation des récepteurs AMPA par la mellétine. En fait, l'action de la mellétine (et du KCl) sur les récepteurs de type AMPA, de même que la LTP, se voient complètement abolie dans l'hippocampe des

très jeunes animaux (5-10 jours). Cet aspect développemental de la régulation des récepteurs au glutamate, qui fait l'objet du deuxième volet de cette thèse, vient bien sûr, appuyer notre hypothèse voulant que les phospholipases endogènes jouent un rôle crucial dans la modification des récepteurs AMPA lors de la LTP. Or, bien que les mécanismes du déficit de modulation des récepteurs AMPA (et de la LTP) chez le très jeune animal ne soient pas encore élucidés, il n'apparaît pas qu'une perte d'activité de la  $PLA_2$  puisse en être responsable (voir page 87).

En fait, les résultats décrits ci-dessus, indiquent que la déficience de modulation chez le jeune animal proviendrait essentiellement d'une incapacité de l'enzyme  $PLA_2$  à agir sur le récepteur AMPA. Cette interprétation est sans aucun doute compatible avec les travaux de Gagné et ses collaborateurs (1996) qui démontrèrent que l'action de la phosphatidylsérine sur le récepteur AMPA est grandement réduite chez le raton âgé de 5-10 jours. Baudry et son groupe ont, quant à eux, montré la présence d'une activité accrue de la calpaine dans les membranes neuronales des jeunes animaux (Simonson, Baudry, Siman et Lynch, 1985). Évidemment, puisque la calpaine favorise, dans certains groupes cellulaires, le flip-flop de la phosphatidylsérine (Zwaal et al., 1989), il est possible que la perte de modulation par l'enzyme  $PLA_2$  soit en lien avec une altération de l'environnement lipidique chez le jeune animal. Tel que vu précédemment, plusieurs études de biologie moléculaire ont montré l'existence d'au moins 4 ARN messagers codant pour la famille des récepteurs AMPA, lesquels sont capables de générer, par épissage alternatif, deux versions étroitement apparentées d'une même protéine. Ces deux versions, nommées flip et flop, possèdent des caractéristiques électrophysiologiques distinctes, la version flip étant beaucoup plus susceptible de générer un influx ionique membranaire que la version flop



(Dingledine et al., 1999). Fait intéressant, il fut démontré que les ARN messagers codant pour les différentes sous-unités du récepteur AMPA sont sujets à une régulation différentielle de leur expression au cours de la période postnatale (Pellegrini-Giampietro, Bennett et Zukin, 1991; Standley, Tocco, Tourigny, Massicotte, Thompson et Baudry, 1995) et il s'avère donc possible que la perte de modulation puisse découler d'un arrangement spécifique des sous-unités composants le récepteurs AMPA chez le jeune animal, lequel récepteur serait insensible à l'action de la PLA<sub>2</sub>.

### **Régulation bidirectionnelle des récepteurs AMPA par la PLA<sub>2</sub>**

La PLA<sub>2</sub> n'est pas seulement impliquée dans la formation de la LTP, mais aussi dans la LTD, un autre modèle de plasticité neuronale. En effet, les études de Fitzpatrick (1994) de même que celle de Normandin et ses collègues (1996), ont démontré que le bromure de bromophénacyl inhibe le phénomène de dépression ainsi que la potentialisation à long terme dans la région hippocampale. L'idée que la PLA<sub>2</sub> présente dans les cellules nerveuses puisse être impliquée à la fois lors de la LTP et de la LTD, apparaît surprenante et, sauf erreur, très peu de travaux ont porté sur l'étude des mécanismes par lesquels la PLA<sub>2</sub> peut contribuer dans ces deux phénomènes de plasticité neuronale. En tenant compte de cette question, nous avons démontré que selon le degré d'activation de la PLA<sub>2</sub>, il est possible de moduler à la baisse et à la hausse l'affinité des récepteurs AMPA dans la région hippocampale. Une faible activation de l'enzyme conduirait à une régulation à la baisse de l'affinité du récepteur AMPA et ce, via la production de composés provenant du métabolisme de l'acide arachidonique. Or, une forte activation de l'enzyme conduirait, rappelons-le, à une hausse de l'affinité du récepteur qui résulterait de changements dans



l'environnement lipidique de ce dernier. En fait, nous proposons que selon son degré d'activation la PLA<sub>2</sub> puisse contribuer à la formation de deux phénomènes de plasticité neuronale qui s'opposent, en l'occurrence la LTP et la LTD.

L'idée qu'une PLA<sub>2</sub> puisse être impliquée dans la plasticité neuronale n'est pas totalement nouvelle. Entre autres, Bliss et ses collaborateurs (1993) ont montré que les produits d'hydrolyse de la PLA<sub>2</sub> (ou leurs dérivés métaboliques) participent au maintien de la LTP dans la région hippocampale. Plus spécifiquement, de nombreuses études ont rapporté que l'acide arachidonique contribue à augmenter le relarguage de glutamate par les terminaisons nerveuses (Bazan, Zorumski et Clark, 1993). Or, cette observation est particulièrement intéressante puisque plusieurs laboratoires ont proposé que la LTP repose, du moins en partie, sur une plus grande relâche de glutamate (hypothèse dite présynaptique) (Bliss, Douglas, Errington et Lynch, 1986; Bliss, Errington, Laroche et Lynch, 1987; Bliss et Lynch MA, 1988; Bliss, 1990). Cette hypothèse semble d'autant plus intéressante que l'intervention de la PLA<sub>2</sub> dans la structure postsynaptique lors de la LTP pourrait être requise à deux niveaux: soit pour la modulation des récepteurs AMPA par les lipides membranaires, soit pour l'augmentation de la relâche de glutamate et ce, suivant l'action rétrograde de l'arachidonate sur la structure présynaptique. Dans le cas de la LTD, nous proposons que des composés provenant de la voie 12-lipoxygénase du métabolisme de l'acide arachidonique puissent moduler à la baisse l'affinité du récepteur AMPA par la PLA<sub>2</sub>. Cette hypothèse n'est d'ailleurs pas dénuée de tous sens puisque plusieurs études ont montré que les métabolites de la voie 12-lipoxygénase (HPETE et HETE) sont capables d'inhiber certaines protéines kinases susceptibles d'augmenter la réponse des récepteurs AMPA, notamment la kinase II dépendante du calcium et la

calmoduline (Piomelli, Wang, Sihra, Nairn, Czernik et Greengard, 1989; Piomelli et Greengard, 1991). Elle est de plus compatible avec la présente démonstration que la baicaleïne (un inhibiteur de la 12-lipoxygénase) bloque la LTD ainsi que la modulation à la baisse du récepteur AMPA par la PLA<sub>2</sub> dans la région hippocampale.

Dans un autre ordre d'idée, plusieurs auteurs ont mis en lumière la contribution de protéines kinases dépendantes du calcium lors de la plasticité neuronale (Malenka, 1994; O'Dell et Kandel, 1994). En particulier, il est déjà bien établi que la phosphorylation de diverses protéines, incluant le récepteur AMPA, est associée à la LTP (Akers, Lovinger, Colley, Linden et Routtenberg, 1986; Barria, Muller, Derkach, Griffith et Soderling, 1997). À l'opposé, les résultats de plusieurs travaux suggèrent que les processus de déphosphorylation par les enzymes phosphatases puissent assurer le développement de la LTD (Mulkey, Herron et Malenka 1993; Mulkey, Endo, Shenolikar et Malenka, 1994). Or, l'enzyme PLA<sub>2</sub> est connue pour posséder divers sites de phosphorylation essentiels pour le contrôle de son activité (Lin, Lin et Knopf, 1992). Nous avons démontré dans la présente étude qu'une protéine kinase peut être impliquée dans le contrôle de l'activité de la PLA<sub>2</sub> et, conséquemment, dans la régulation des récepteurs AMPA. Plus précisément, la protéine kinase C apparaît impliquée dans la modulation par la PLA<sub>2</sub> puisque les activateurs PDBu et PMA amplifient la régulation à la hausse du récepteur AMPA. En ce qui a trait aux phosphatases, nous avons observé que seule la régulation à la baisse des récepteurs AMPA est affectée par un inhibiteur de certaines de ces enzymes (phosphatases 1 et 2A), l'acide okadéique. Cette observation est d'autant plus intéressante puisqu'il a été démontré que cet inhibiteur des protéines phosphatases interfère avec le développement de la LTD dans l'hippocampe (Mulkey et al., 1994; Mulkey et al., 1993). Ces informations,

de concert avec celles relatives à l'inhibition de la PLA<sub>2</sub> par l'acide okadéique dans les plaquettes sanguines (Chiang, 1993), cadrent très bien avec l'implication de la PLA<sub>2</sub> dans le processus de régulation des récepteurs AMPA lors de la LTD.

L'ensemble de nos résultats nous amène à suggérer un nouveau modèle biochimique de la plasticité neuronale, caractérisé par une régulation bidirectionnelle du récepteur AMPA par l'enzyme PLA<sub>2</sub>. Plus spécifiquement, nous proposons que suite à l'activation des récepteurs NMDA plusieurs systèmes enzymatiques puissent se voir impliqués dans la régulation de l'activité de la PLA<sub>2</sub>. Ainsi, l'entrée de calcium dans la structure postsynaptique qui surviendrait suite à une stimulation modérée du récepteur NMDA, serait en mesure de favoriser l'activité des phosphatases, lesquelles pourraient à leur tour altérer l'activité de la PLA<sub>2</sub> de manière à réduire l'affinité des récepteurs AMPA. Dans ce cas précis, la modulation à la baisse du récepteur AMPA par la PLA<sub>2</sub> s'effectuerait par l'intermédiaire de produits dérivant de la voie 12-lipoxygénase du métabolisme de l'acide arachidonique. Par ailleurs, la stimulation des protéines kinases survenant lors d'une activation importante des récepteurs NMDA permettrait de générer une activité de l'enzyme PLA<sub>2</sub> telle qu'elle produirait des changements lipidiques capables de moduler à la hausse l'affinité des récepteurs AMPA.

En somme, nos travaux ont permis d'intégrer diverses informations relatives à la régulation des récepteurs AMPA par certains systèmes enzymatiques, notamment la PLA<sub>2</sub> et les enzymes impliquées dans la phosphorylation des protéines, dans un modèle biochimique cohérent de plasticité neuronale.

## RÉFÉRENCES

- Abeliovich, A., Chen, C., Goda, Y., Silva, C. F., & Tonegawa, S. (1993). Modified hippocampal LTP in PKC $\gamma$ -mutant mice. *Cell*, 75, 1253-1262.
- Abeliovich, A., Paylor, R., Chen, C., Kim, J. J., Wehner, J. M., & Tonegawa, S. (1993). PKC $\gamma$ -mutant mice exhibit mild deficits in spatial and contextual conditioning. *Cell*, 75, 1263-1271.
- Akers, R. F., Lovinger, D. M., Colley, P. A., Linden, D. J., & Routtenberg, A. (1985). Translocation of protein kinase C activity may mediate hippocampal long-term potentiation. *Science*, 231, 587-589.
- Akers, R. F., Lovinger, D. M., Colley, P. A., Linden, D. J., & Routtenberg, A. (1986). Translocation of protein kinase C activity may mediate hippocampal long-term potentiation. *Science*, 231, 587-589.
- Arai, A., Larson, J., & Lynch, G. (1990). Anoxia reveals a vulnerable period in the development of long-term potentiation. *Brain Research*, 511, 353-357.
- Aronica, E., Frey, U., Wagner, M., Schroeder, H., Krug, M., Ruthrich, H., & Catania, M. (1991). Sensitivity of metabotropic glutamate receptors after induction of long-term potentiation in rat hippocampus. *Journal of Neurochemistry*, 57, 376.
- Aronica, E., Casabona, G., Genazzani, A. A., Catania, M. V., Contestabile, A., Virgili, M., & Nicoletti, F. (1992). Melittin enhances excitatory amino acid release and AMPA-stimulated  $45\text{Ca}^{2+}$  influx in cultured neurons. *Brain Research*, 586, 72-77.
- Artola, A., Broecher, S., & Singer, W. (1990) Different voltage-dependent thresholds for inducing long-term depression and long-term potentiation in slices of rat visual cortex. *Nature* 347:69-72.

- Artola, A., & Singer, W. (1993). Long-term depression of excitatory synaptic transmission and its relationship to long-term potentiation. *Trends in Neuroscience*, 16, 480-488.
- Bar, P. R., Schotmann, P., Gipsen, W. H., Tielen, A. M., Lopes, K. A., & Silva, F. H. (1980). Changes in synaptic membranes phosphorylation after tetanic stimulation in the dentate area of the rat hippocampal slice. *Science*, 198, 478-484.
- Barnes, C. A. (1995). Involvement of LTP in memory: are we searching under the street light? *Neuron*, 15, 751-754.
- Barria, A., Muller, D., Derkach, V., Griffith, L. C., & Soderling, T. R. (1997). Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science* 276, 2042-2045.
- Bazan, N. G., Zorumski, C. F., & Clark, G. D. (1993). The activation of phospholipase A2 and release of arachidonic acid and other lipid mediators at the synapse: The role of platelet-activating factor. *Journal of Lipid Mediators*, 6, 421-427.
- Bashir, Z. I., Tam, B., & Collingridge, G. L. (1990). Activation of the glycine site in the NMDA receptor is necessary for induction of LTP. *Neuroscience Letters*, 108, 261-266.
- Baudry, M., Arst, D. S., & Lynch, G. (1981). Increased [ $^3\text{H}$ ]glutamate receptor binding in aged rats. *Brain Research*, 223, 195-198.
- Baudry, M., Arst, D. S., Oliver, M., & Lynch, G. (1981). Development of glutamate binding sites and their regulation by calcium in rat hippocampus. *Brain Research*, 227, 37-48.
- Baudry, M., & Massicotte, G. (1992). Physiological and pharmacological relationships between long-term potentiation and mammalian memory. *Concept in Neurosciences*, 3, 79-98.
- Baudry, M., Massicotte, G., & Hauge, S. (1991b). Opposite effects of  $\text{PLA}_2$  on [ $^3\text{H}$ -AMPA] binding in adult and neonatal membranes. *Brain Research*, 61, 265-267.
- Bear, M. F., & Malenka, R. C. (1994). Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Current Opinion in Neurobiology*, 4, 389-399.
- Berger, T. W., & Thompson, R. F. (1978). Identification of the pyramidal cells as the critical elements in hippocampal neuronal plasticity during learning. *Proceeding of the International Academy of Sciences*, 75, 1572-1576.

- Bernard, J., Lahsaini, A., & Massicotte, G. (1994). Potassium-induced long-term potentiation in area CA<sub>1</sub> of the hippocampus involves phospholipase activation. *Hippocampus*, 4, 447-453.
- Bettler, B., & Mulle, C. (1995). AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology*, 34, 123-140.
- Bi, X., Chang, V., Molnar, E., McIlhinney, J., & Baudry, M. (1996). The C-terminal domain of GluR1 subunits is a target for calpain-mediated proteolysis. *Neuroscience*, 73, 903-906.
- Bi, X., Chang, V., Dang, S., Wenthold, R. J., Tocco, G., & Baudry, M. (1997). Characterization of calpain-mediated proteolysis of GluR1 subunits of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate receptors in rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 68, 1484-1494.
- Bi, X., Tocco, G., & Baudry, M. (1994). Calpain-mediated regulation of AMPA receptors in adult rat brain. *Neuroreport*, 6, 61-64.
- Bliss, T. V., Douglas, R. M., Errington, M. L., & Lynch, M. A. (1986). Correlation between long-term potentiation and release of endogenous amino acids from dentate gyrus of anesthetized rats. *Journal of Physiology* (London), 337, 391-408.
- Bliss, T. V., Errington, M. L., Laroche, S., & Lynch, M. A. (1987). Increase in K<sup>+</sup>-stimulated, Ca<sup>2+</sup>-dependent release of [3H]glutamate from rat dentate gyrus three days after induction of long-term potentiation. *Neuroscience Letters*, 83, 1-2.
- Bliss, T. V., & Lynch, M. A. (1988). Long-term potentiation: mechanisms and properties. In Long-term potentiation: From biophysics to behavior. Landfield PW, Deadwyler SA (Ed), Alan Liss, New York, 3-72.
- Bliss, T. V. (1990). Maintenance is presynaptic. *Nature*, 346, 698-699.
- Bliss, T. V., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361, 31-39.
- Borghese, C. A., Gomez, R. A., & Ramirez, O. A. (1993). Phosphatidylserine increases hippocampal synaptic efficacy. *Brain Research Bulletin*, 31, 697-700.
- Bortollo, Z. A., & Collingridge, G. L. (1993). Characterisation of LTP induced by the activation of glutamate metabotropic receptors in area CA<sub>1</sub> of the hippocampus. *Neuropharmacology*, 32, 1-9.



- Boulter, J., Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A., Hartley, M., Deneris, E., Maron, C., & Heinemann, S. (1990). Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes. *Science*, 249, 1033-1037.
- Breakwell, W. A., Rowan, M. J. & Anwyl, R. (1998). MCPG blocks induction of LTP in CA<sub>1</sub> of rat hippocampus via agonist action at an mGluR group II receptor. *Journal of neurophysiology*, 79, 1270-1276.
- Brusa, R. (1999). Genetically modified mice in neuropharmacology. *Pharmacological Research*, 39 (6), 405-419.
- Burger, T. W., & Thompson, R. F. (1978). Identification of the pyramidal cells as the critical elements in hippocampal neuronal plasticity during learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75, 1572-1576.
- Camoratto, A. M. & Grandison, L. (1985). Evidence supporting a correlation between arachidonic acid release and prolactin secretion from GH3 cells. *Endocrinology*, 116 (4), 1506-1513.
- Carlin, R.K., Bartlet, D. C., & Siekevitz, P. (1983). Identification of fodrin as a major calmodulin-binding protein in postsynaptic density preparations. *Journal of Cellular Biology*, 96, 443-448.
- Chabot, C., Massicotte, G., Milot, M., Trudeau, F., & Gagné, J. (1997). Impaired modulation of AMPA receptors by calcium-dependent processes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Brain Research*, 768, 249-256.
- Chiang, T. M. (1993). The role of protein phosphatase 1 and 2A in collagen-platelet interaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 302, 56-63.
- Collingridge, G. L., Kehl, S. J., & McLennan, H. (1983). The antagonism of amino acid-induced excitations of rat hippocampal CA<sub>1</sub> neurons in vitro. *Journal of Physiology*, 334, 19-31.
- Collingridge, G. L., & Singer, W. (1990). Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends in Pharmacological Sciences*, 11, 290-296.
- Comfurius, P., Bevers, E. M., & Zwaal, R. F. (1989). Interaction between phosphatidylserine and the isolated cytoskeleton of human blood platelets. *Biochimica and Biophysica Acta*, 983, 212-216.

- Comfurius, P., Senden, J.M.G., Tilly, R. H. J., Schroit, A. J., Bevers, E. M., & Zwaal, R. F. A. (1990). Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1026, 153-60.
- Cruickshank, A. M., & Henley, J. M. (1994). Phospholipase A<sub>2</sub> enhances <sup>3</sup>H-AMPA binding to a putative homomeric GluR-B receptor in the rat spinal cord. *FEBS letters* 339, 168-170.
- Cummings, J. L., Tomiyasu, U., Read, S., & Benson, D. F. (1984). Amnesia with hippocampal lesions after cardiopulmonary arrest. *Neurology*, 34 (5), 679-681.
- Conn, P. J., & Pin, J. P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 37, 205-237.
- Davies, S. N., Lester, R. A., Reymann, K. G., & Collingridge, G. L. (1989). Temporally distinct pre- and post-synaptic mechanisms maintain long-term potentiation. *Nature*, 338, 500-503.
- Dejong, R. N., Itabashi, H. H., & Olson, R.J. (1968). Pure memory loss with hippocampal lesions: A case report. *Transactions of the American Neurology Association*, 93, 31-34.
- Del Cerro, S., Larson, J., Oliver, M. W., & Lynch, G. (1990). Development of hippocampal long-term potentiation is reduced by recently introduced calpain inhibitors. *Brain Research*, 530, 91-95.
- Denny, J. B., Polan-Curtain, J., Ghuman, A., Wayner, M. J., & Armstrong, D. L. (1990). Calpain inhibitors block long-term potentiation. *Brain Research*, 534, 317-320.
- Dev, K. K., Honore, T., Henley, J. M. (1998). Different effects of phospholipase A<sub>2</sub> on agonist binding to hippocampal, cortical and recombinant homomeric alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionate receptors. *Neuroscience Letters*, 246, 25-28.
- Diamond, D. M., Dunwiddie, T. V., & Rose, G. M. (1988). Characteristics of hippocampal primed burst potentiation *in vitro* and in the awake rat. *Journal of Neuroscience*, 8, 4079-4088.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., & Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews*, 51, 7-61.



- Dong, H., O'Brien, R. J., Fung, E. T., Lanahan, A. A., Worley, P. F., & Huganir, R. L. (1997). GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors. *Nature*, 386, 279-284.
- Dudek, S. M., & Bear, M. (1993). Bidirectional long-term modification of synaptic effectiveness in the adult and immature hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 13, 2910-2918.
- Dumuis, A., Sebben, M., Haynes, L., Pin, J. P., & Bockaert, J. (1988). NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature*, 336, 69-70.
- Edwards, F. A. (1991). LTP is a long-term problem. *Nature*, 350, 271-272.
- Eichenbaum, H., Cohen, N. J., Otto, T., & Wible, C. (1991). Memory representation in the hippocampus: functional domain and functional organization. In L. R. Squire, N. M. Weinberger, G. L. Lynch & J. L. McGaugh (Éds), *Memory: organization and locus of change* (pp. 163-204). New York: Oxford University Press.
- Eichenbaum, H., Otto, T., & Cohen, N. J. (1992). The hippocampus: What does it do? *Behavioral Neural Biology*, 57, 2-36.
- Fitzpatrick, J. S., & Baudry, M. (1994). Blockage of long-term depression in neonatal hippocampal slices by a phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors. *Developmental Brain Research*, 78, 81-86.
- Fletcher, J. E., Michaux, K. & Jiang, M. S. (1990). Contribution of bee venom PLA<sub>2</sub> contamination in melittin fractions to presumed activation of tissue PLA<sub>2</sub>. *Toxicon*, 28 (6), 647-656.
- Fletcher, J. E., & Jiang, M. (1993). Possible mechanisms of action of cobra snake venom cardiotoxins and bee venom melittin. *Toxicon*, 31, 669-695.
- Foster, T. C., Gagné, J., & Massicotte, G. (1996). Mechanism of altered synaptic strength due to experience: relation to long-term potentiation. *Brain Research*, 736, 243-250.
- Friedrich, P. (1990). Protein structure: The primary substrate for memory. *Neuroscience*, 35, 1-7.
- Gagné, J., Giguère, C., George, T., Ohayon, M., Thompson, R. F., Baudry, M., & Massicotte, G. (1996). Effect of phosphatidylserine on the binding properties of glutamate receptors in brain sections from adult and neonatal rats. *Brain research*, 740, 337-345.

- Gagné, J., Gélinas, S., Martinoli, M. G., Foster, T. C., Ohayon, M., Thompson, R. F., Baudry, M., & Massicotte, G. (1998). AMPA receptor properties in adult rat hippocampus following environmental enrichment. *Brain Research*, 799, 16-25.
- Gellerman, D. M., Bi, X., & Baudry, M. (1997). NMDA receptor-mediated regulation of AMPA receptor properties in organotypic hippocampal slice cultures. *Journal of Neurochemistry*, 69, 131-136.
- Gerlai, R. (1996). Gene-targeting studies of mammalian behavior: is in the mutation or the background genotype? *Trends in Neuroscience*, 19, 177-181.
- Gol, A., & Faibish, G. M. (1967). Effects of human hippocampal ablation. *Journal of Neurosurgery*, 26, 390-398.
- Goldenring, J. R., McGuire, J. J., & DeLorenzo, R. J. (1984). Identification of the major postsynaptic density protein as homologous with the major calmodulin-binding subunit of a calmodulin-dependent protein kinase. *Journal of Neurochemistry*, 42, 1077-1084.
- Glaser, K. B., Sung, A., Bauer, J., & Weichman, B. M. (1993). Regulation of eicosanoid biosynthesis in the macrophage. Involvement of protein tyrosine phosphorylation and modulation by selective protein tyrosine kinase inhibitors. *Biochemistry and pharmacology*, 9, 45 (3), 711-721.
- Grant, S. G. N., O'Dell, T. J., Karl, K. A., Stein, P. L., Soriano, P., & Kandel, E. R. (1992). Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in *fyn* mutant mice. *Science*, 258, 1903-1910.
- Greengard, P., Pen, J., Nairn, A. C., & Stevens, C. F. (1991). Enhancement of the glutamate receptor response by cAMP dependent protein kinase in hippocampal neurons. *Science*, 253, 1135-1138.
- Greenstein, Y. J., Pavlides, C., & Winson, J. (1988). Long-term potentiation in the dentate gyrus is preferentially induced at theta rhythm periodicity. *Brain Research*, 438, 331-334.
- Gustafsson, B., Huang, Y. Y., & Wigstrom, H. (1988). Phorbol ester-induced potentiation differs from long-term potentiation in the guinea-pig hippocampus in vitro. *Neuroscience Letters*, 85, 77-81.
- Gustafsson, B., & Wigstrom, H. (1990). Long term potentiation in the CA<sub>1</sub> region: its induction and early temporal development. *Program in Brain Research*, 83, 223-232.

- Hanson, P. I., Roth, R., Morisaki, H., Jahn, R., & Heuser, J. E. (1997). Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell*, 90, 523-535.
- Harris, K. M., & Teyler, T. J. (1984). Developmental onset long-term potentiation in area CA<sub>1</sub> of the rat hippocampus. *Journal of Physiology (London)*, 346, 27-48.
- Hebb, D. O. (1949). *The organization of behavior : a neuropsychological theory*. New York: John Wiley and sons, 335 pages.
- Hirsh, R. (1974). The hippocampus and contextual retrieval of information from memory: A theory. *Behavior in Neural Biology*, 12, 421-444.
- Hollmann, M., & Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annual Review of Neurosciences*, 17, 31-108.
- Hong, R.-M., Mori, H., Fukui, T., Moriyama, Y., Futai, M., Yamamoto, A., Tashiro, Y., and Tagaya, M. (1994). Association of the N-ethylmaleimide-sensitive factor with synaptic vesicles. *FEBS letters*, 350, 253-257.
- Huang, Y.-Y., Kandel, E. R., Varshavsky, L., Brandon, E. P., Qi, M., Idzerda, R. L., McKnight, G. S., & Bourchouladze, R. (1995). A genetic test of the effects of mutations in PKA on mossy fiber LTP and its relation to spatial and contextual learning. *Cell*, 83, 1211-1222.
- Huerta, P. T., Searce, K. A., Farris, S. M., Empson, R. M., & Prusky, G. T. (1996). Preservation of spatial learning in fyn tyrosine kinase knockout mice. *Neuroreport*, 7, 1685-1689.
- Jacob, M. (1997). Identification et caractérisation de nouveaux types de phospholipases A<sub>2</sub> dans deux fractions subrétinienne autre que les segments externes de bâtonnets. *Thèse de doctorat inédite*, Université du Québec à Trois-Rivières
- Jarrard, L. E. (1993). On the role of the hippocampus in learning and memory in rat. *Behavior in Neural Biology*, 60, 9-26.
- Jonas, P., & Burnashev, N. (1995). Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels. *Neuron*, 15, 987-990.
- Jonas, P., Racca, C., Sakmann, B., Seeburg, P. H., & Monyer, H. (1994). Differences in Ca<sup>2+</sup> permeability of AMPA-type glutamate receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression. *Neuron*, 12, 1281-1289.

- Jung, M. W., Larson, J., & Lynch, G. (1991). Evidence that changes in spine neck resistance are not responsible for expression of LTP. *Synapse*, 7, 216-220.
- Kauer, J. A., Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1988). A persistent postsynaptic modification mediates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuron*, 1, 911-917.
- Keinänen, K., Wisden, W., Sommer, B., Werner, P., Herb, A., Verdoorn, T. A., Sakmann, B., & Seeburg, P. H. (1990). A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science*, 249, 556-560.
- Kelly, P. T., McGuinness, T. L., & Greengard, P. (1984). Evidence that the major postsynaptic density protein is a component of a  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81, 945-949.
- Kennedy, M. B., Bennett, M. K., & Erondy, N. E. (1983). Biochemical and immunochemical evidence that the « major postsynaptic density protein » is a subunit of a calmodulin-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80, 7357-7361.
- Kim, D. Y., Rordorf, G., Nemenoff, R. A., Koroshetz, W. J., & Bonventre, J. V. (1995). Glutamate stably enhances the activity of two cytosolic forms of phospholipase  $\text{A}_2$  in brain cortical cultures. *Biochemistry Journal*, 310, 83-90.
- Kovalchuk, Y., Miller, B., sarantis, M., & Attwell, D. (1994). Arachidonic acid depresses non-NMDA receptor currents. *Brain Research*, 643, 287-295.
- Kullmann, D. M., & Nicoll, R. A. (1992). Long-term potentiation is associated with increases in quantal content and quantal amplitude. *Nature*, 357, 240-244.
- Larson, J., & Lynch, G. (1988). Role of N-methyl-D-aspartate receptors in the induction of synaptic potentiation by stimulation patterned after the hippocampal theta rhythm. *Brain Research*, 441, 111-118.
- Larson, J., Wong, D., & Lynch, G. (1986). Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for induction of long-term potentiation. *Brain Research*, 368, 347-350.
- Lavoie, C., Jolicoeur, P., & Paiement, J. (1991). Accumulation of polyunsaturated free fatty acids coincident with fusion of rough endoplasmic reticulum membranes. *Biochimica and biophysica acta*, 1070, 274-278.
- Liao, D., Jones, A., & Malinow, R. (1992). Direct measurements of quantal changes underlying long-term potentiation in CA1 hippocampus. *Neuron*, 9, 1089-1097.

- Lin, L. I., Lin, A. Y., Knopf, J. L. (1992). Cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> is coupled to hormonally regulated release of arachidonic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 89, 6147-6151.
- Linden, D. J., Sheu, F. S., Murakami, K., & Routtenberg, A. (1987). Enhancement of long-term potentiation by *cis*-unsaturated fatty acid: relation to protein kinase C and phospholipase A<sub>2</sub>. *Journal of Neuroscience*, 7, 3783-3792.
- Lisman, J. E., & Goldring, M. A. (1988). Feasibility of long-term storage of graded information by the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent protein kinases molecules of the post-synaptic density. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83, 5320-5324.
- Lisman, J. E., & Harris, K. M. (1993). Quantal analysis and synaptic anatomy – integrating two views of hippocampal plasticity. *Trends in Neurosciences*, 6, 141-147.
- Lledo, P. M., Zhang, X., Südhof, T. C., Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1998). Postsynaptic membrane fusion and long-term potentiation. *Science*, 279, 399-403.
- Loh, H. H., & Law, P. Y. (1988). The rôle of membrane lipids in receptor mechanisms. *Annual record of pharmacology and toxicology*, 20, 210-234.
- Lovinger, D. M., Wong, K. L., Murakami, K., & Routtenberg, A. (1987). Protein kinase C inhibitors eliminate hippocampal long-term potentiation. *Brain Research*, 436, 177-183.
- Loww, A. I. & Visser, L. (1978). The synergism of cardiotoxin and phospholipase A<sub>2</sub> in hemolysis. *Biochemistry and biophysical acta*, 512 (1), 163-171.
- Lynch, G., & Baudry, M. (1984). The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis. *Science*, 224, 1057-1063.
- Lynch, G., Larson, J., Kelso, S., Barrionuevo, G., & Schottler, F. (1983). Intracellular injections of EGTE block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature*, 305, 20-26.
- Malenka, R. C., Kauer, J. A., Zucker, R. J., & Nicoll, R. A. (1988). Post-synaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission. *Science*, 242, 81-84.
- Malenka, R. C., Lancaster, B., & Zucker, R.S. (1992). Temporal limits on the rise in postsynaptic calcium required for the induction of long-term potentiation. *Neuron*, 9, 121-128.



- enka, R. C., Madison, D. V., & Nicoll, R. A. (1986). Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus by phorbol esters. *Nature*, 321, 175-177.
- enka, R. C. (1994). Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell*, 78, 535-538.
- inow, R., Madison, D. V., & Tsien, R. W. (1988). Persistent protein kinase activity underlying long-term potentiation. *Nature*, 335, 820-824.
- abe, T., Wyllie, D. J. A., Perkel, D. J. & Nicoll, R. A. (1993). Modulation of synaptic transmission and long-term potentiation: effects of paired pulse facilitation and EPSC variance in the CA1 region of the hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, 70, 1451-1459.
- ahan-Vaughan, D., & Reymann, K. G. (1996). Metabotropic glutamate receptor subtype agonists facilitate LTP within a distinct time window in the dentate gyrus in vivo. *Neuroscience*, 74, 723-731.
- en, S., Tocco, G., Standley, S., Baudry, M., & Thompson, R. F. (1993). Postsynaptic factors in the expression of long-term potentiation (LTP): Increased glutamate receptor binding following LTP induction in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 90, 9654-9658.
- en, S., & Fanselow, M. S. (1996). The amygdala and fear conditioning: has the nut been cracked? *Neuron*, 16, 237-240.
- sicotte, G., & Baudry, M. (1990). Modulation of AMPA/quisqualate receptors by phospholipase A<sub>2</sub> treatment. *Neuroscience Letters*, 118, 245-249.
- sicotte, G., Baudry, M., & Hauge, S. (1991). Phosphatidylserine increases the affinity of the AMPA/Quisqualate receptor in rat brain membranes. *Behavior in Neural Biology*, 55, 137-140.
- sicotte, G., Kessler, M., Lynch, G., & Baudry, M. (1990). N-methyl-D-aspartate and quisqualate/AMPA receptors: differential regulation by phospholipase C treatment. *Molecular Pharmacology*, 32, 278-285.
- sicotte, G., Oliver, M. W., Lynch, G., & Baudry, M. (1990). Effect of bromophenacyl bromide, a phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor, on the induction and maintenance of LTP in hippocampal slices. *Brain Research*, 537, 49-53.

- Masicotte, G., Vanderklish, P., Lynch, G., & Baudry, M. (1991). Modulation of DL-alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid quisqualate receptors by phospholipase A<sub>2</sub>- a necessary step in long-term potentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 88, 1893-1897.
- Mayer, M. L., Westbrook, G. L., & Guthrie, P. B. (1984). Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurons. *Nature*, 309, 261-263.
- McDermott, A. B., Mayer, M. L., Westbrook, G.L., Smith, S. J., & Barker, J.L. (1986). NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurons. *Nature*, 321, 519-522.
- McEachern, J. C., Shaw, C. A. (1996). An alternative to the LTP orthodoxy: a plasticity-pathology continuum model. *Brain Research Review*, 22, 51-92.
- McNaughton, B. L. (1982). Long-term synaptic enhancement and short-term potentiation in the hippocampus. *European Journal of Pharmacology*, 197, 231-232.
- McGuinness, N., Anwyl, R., & Rowan, M. (1991). Trans-ACPD enhances long-term potentiation in the hippocampus. *European Journal of Pharmacology*, 197, 231-232.
- Miller, S. G., & Kennedy, M. B. (1986). Regulation of brain type II Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: A Ca<sup>2+</sup> triggered molecular switch. *Cell*, 44, 861-870.
- Miller, B., Sarantis, M., Traynelis, S. F., & Attwell, D. (1992). Potentiation of NMDA receptor currents by arachidonic acid. *Nature*, 355, 722-725.
- Morin, C., Langlais, J., & Lambert, R. D. (1992). Possible implication of lysophosphatidylcholine in cell fusion accompanied implantation in rabbits. *Journal of reproduction and fertility*, 96, 827-836.
- Morris, R. G. M., Anderson, E., Lynch, G. S., & Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by the N-methyl-D-aspartate receptor agonist, AP-5. *Nature*, 319, 774-776.
- Moser, M. B., Trommaid, M., & Andersen, P. (1994). An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 91, 12673-12675.

- Motro, B., Wojtowicz, J. M., Bernstein, A., & Van Der Kooy, D. (1996). Steel mutant mice are deficient in hippocampal learning but not long-term potentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 1808-1813.
- Mulkey, R. M., & Malenka, R. C. (1992). Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA<sub>1</sub> of the hippocampus. *Neuron*, 9, 967-975.
- Mulkey, R. M., Herron, C. E., Malenka, R. C. (1993). An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. *Science*, 261, 1051-1055.
- Mulkey, R. M., Endo, S., Shenolikar, S. S., & Malenka, R. C. (1994). Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature*, 486-488.
- Muller, D., Buschs, P. A., Dunant, Y., & Lynch, G. (1990). Protein Kinase C activity I not responsible for the expression of long-term potentiation in hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 4073-4077.
- Muller, D., Joly, M., & Lynch, G. (1988). Contributions of quisqualate and NMDA receptors to the induction and expression of LTP. *Science* 242, 1694-1697.
- Muller, D., & Lynch, G. (1989). Evidence that changes in presynaptic calcium currents are not responsible for long-term potentiation in hippocampus. *Brain Research*, 479, 290-299.
- Muramoto, O., Kuru, Y., Sugishita, M., & Toyokura, Y. (1979). Pure memory loss with hippocampal lesions: A pneumoencephalographic study. *Archeive of Neurology*, 36, 54-56.
- Nakanishi, S., & Masu, M. (1994). Molecular diversity and functions of glutamate receptors. *Nature*, 368, 740-743.
- Nishimune, A., Isaac, J. T. R., Molnar, E., Noel, J., Nash, S. R., Tagaya, M., Collingridge, G. L., Nakanishi, S., & Henley, J. M. (1998). NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission. *Neuron*, 21, 87-97.
- Normandin, M., Gagné, J., Bernard, J., Élie, D., Miceli, D., Baudry, M., & Massicotte, G. (1996). Involvement of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in homosynaptic long-term depression of the rat hippocampus. *Brain Research*, 78, 81-86.



- Nosten-Bertrand, M., Errington, M. L., Murphy, K. P. S. J., Tokugawa, Y., Barboni, E., Zozlova, E., Michalovich, D., Morris, R. C. M., Silver, J., Stewart, C. L., Bliss, T. V. P., & Morris, R. J. (1996). Normal spatial learning despite regional inhibition of LTP in mice lacking Thy-1. *Nature*, 379, 826-829.
- Nowack, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbert, A., & Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature*, 307, 462-465.
- O'Dell, T. J., & Kandel, E. R. (1994). Low-frequency stimulation erases LTP through an NMDA receptor-mediated activation of protein phosphatases. *Learning and Memory*, 1, 129-139.
- Okada, D., Yamagishi, S., & Sugiyama, H. (1989). Differential effects of phospholipase inhibitors in long-term potentiation in the rat hippocampal mossy fiber synapses and Shaffer/commissural synapses. *Neuroscience Letters*, 100, 141-146.
- Oliver, M. W., Baudry, M., & Lynch, G. (1989). The protease inhibitor leupeptin interferes with the development of LTP in hippocampal slices. *Brain Research*, 505, 233-238.
- Osten, P., Srivastava, S., Inman, G. J., Vilim, F. S., Khatri, L., Lee, L. M., States, B. A., Einheber, S., Milner, T. A., Hanson, P. I., & Ziff, E. B. (1998). The AMPA receptor GluR2 C terminus can mediate a reversible, ATP-dependent interaction with NSF and  $\alpha$ - and  $\beta$ -SNAPS. *Neuron*, 21, 99-110.
- O'Keefe, J., & Nadel, L. (1978). *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford: Clarendon Press, 570 pages.
- Osten, P., Srivastava, S., Inman, G. J., Vilim, F. S., Khatri, L., Lee, L. M., States, B. A., Einheber, S., Milner, T. A., Hanson, P. I., & Ziff, E. B. (1998). The AMPA Receptor GluR2 terminus can mediate a reversible, ATP-dependent interaction with NSF and  $\alpha$ - and  $\beta$ -SNAPS. *Neuron*, 21, 99-110.
- Pellegrini-Giampietro, D. E., Bennett, M. V. L., Zukin, R. S. (1991). Differential expression of three glutamate receptor genes in developing rat brain: an in situ hybridization study. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 88, 4157-4161.
- Perlmutter, L. S., Siman, R., Gall, C., Seubert, P., Baudry, M., Baudry, M., & Lynch, G. (1988). The ultrastructural localization of calcium-activated protease "calpain" in rat brain. *Synapse*, 2, 79-88.

- Piomelli, D., Wang, J. K., Sihra, T. S., Nairn, A. C., Czernik, A. J., & Greengard, P. (1989). Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II by arachidonic acid and its metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences (U S A)*, 86, 8550-8554.
- Piomelli, D., & Greengard, P. (1990). Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in neuronal transmembrane signalling. *Trends in Pharmacological Sciences*, 11, 367-373.
- Piomelli, D., & Greengard, P. (1991). Bidirectional control of phospholipase A2 activity by  $\text{Ca}^{++}$ /calmodulin-dependent protein kinase II, cAMP-dependent protein kinase, and casein kinase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 6770-6774.
- Pritchett, D. B., Sontheimer, H., Shivers, B. D., Ymer, S., Kettenmann, H., Schofield, P. R., & Seeburg, P. H. (1989). Importance of a novel GABA receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature*, 338, 582-585.
- Püschel, A. W., O'Connor, V., & Betz, H. (1994). The N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) is preferentially expressed in the nervous system. *FEBS Letters*, 347, 55-58.
- Raman, I. M., Zhang, S., & Trussell, L. O. (1994). Pathway-specific variants of AMPA receptors and their contribution to neuronal signaling. *Journal of Neurosciences*, 14, 4998-5010.
- Reymann, K. G., Frey, U., Jork, R., & Matthies, H. (1988). Polymixin B, an inhibitor of protein kinase C, prevents the maintenance of synaptic long-term potentiation in hippocampal  $\text{CA}_1$  neurons. *Brain Research*, 440, 305-314.
- Riedel, G., & Reymann, K. G. (1996). Metabotropic glutamate receptors in hippocampal long-term potentiation and learning and memory. *Acta Physiologica Scandinavica*, 157, 1-19.
- Sakimura, K., Kutsuwada, T., Ito, I., Manabe, T., Takayama, C., Kushiya, E., Yagi, T., Aizawa, S., Inoue, Y., Sugiyama, H., & Mishina, M. (1995). Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor 1 subunit. *Nature*, 373, 151-155.
- Schweizer, F. E., Dresbach, T., DeBello, W. M., O'Connor, V., Augustine, G. J., & Betz, H. (1998). Regulation of neurotransmitter release kinetics by NSF. *Science*, 279, 1203-1206.

- Seeburg, P. H. (1996). The role of RNA editing in controlling glutamate receptor channel properties. *Journal of Neurochemistry*, 66, 1-5.
- Seubert, P., Larson, J., Oliver, M., Jung, M. W., Baudry, M., Baudry, M., & Lynch, G. (1988). Stimulation of NMDA receptors induces proteolysis of spectrin in hippocampus. *Brain Research*, 460, 189-194.
- Shors, T. J., & Matzel, L. D. (1997). Long-term potentiation: what's learning got to do with it? *Behavior in Brain Research*, 20 (4), 597-655.
- Silva, A. J., Paylor, R., Wehner, J. M., & Wang, Y. (1992a). Impaired spatial learning in  $\alpha$ -calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science*, 257, 206-211.
- Silva, A. J., Stevens, C. F., Tonegawa, S., & Wang, Y. (1992b). Deficient hippocampal long-term potentiation in  $\alpha$ -calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science*, 257, 201-206.
- Siman, R., Baudry, M., & Lynch, G. (1985). Regulation of glutamate receptor binding by the cytoskeletal protein fodrin. *Nature*, 313, 225-228.
- Simonson, L., Baudry, M., Siman, R., & Lynch, G. (1985). Regional distribution of soluble calcium activated proteinase activity in neonatal and adult rat brain. *Brain Research*, 327, 1-2.
- Söllner, T., & Rothman, J. E. (1994). Neurotransmission : harnessing fusion machinery at the synapse. *Trends in Neurosciences*, 17, 344-348.
- Sommer, B., Keinänen, K., Verdoorn, T. A., Wisden, W., & Burnashev, P. H. (1990). Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science*, 249, 1580-1585.
- Sommer, B., Monyer, H., Wisden, W., Versdoon, T. A., Burnashev, N., Sprengel, R., Sakmann, B., & Seeburg, P. H. (1992). Glutamate-gated ion channels in the brain. *Drug Research*, 42, 209-210.
- Song, I., Kamboj, S., Xia, J., Dong, H., Liao, D., & Huganir, R. L. (1998). Interaction of the N-ethylmaleimide-sensitive factor with AMPA receptors. *Neuron*, 21, 393-400.
- \* Squire, L. (1987). *Memory and brain*. New York: Oxford University Press, 315 pages.
- Squire, L. (1992). Memory and the hippocampus: A synthesis from findings with rats, monkeys and humans. *Psychological Review*, 99, 195-231.

- Standley, S., Tocco, G., Tourigny, M. F., Massicotte, G., Thompson, R. F., Baudry, M. (1995). Developmental changes in amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptor properties and expression in the rat hippocampal formation. *Neuroscience*, 67, 881-892.
- Staubli, U., Larson, J., & Lynch, G. (1990). Mossy fiber potentiation and long-term potentiation involve different expression mechanisms. *Synapse*, 5, 333-335.
- Sutherland, R. J., & Rudy, J. W. (1989). Configural association theory: The role of the hippocampal formation in learning, memory and amnesia. *Psychobiology*, 17, 129-144.
- Tocco, G., Massicotte, G., Standley, S., Thompson, R. F., & Baudry, M. (1992). Effect of temperature and calcium on the binding properties of the AMPA receptor in frozen rat brain sections. *European Journal of Neuroscience*, 4, 1093-1103.
- Umemori, H., Sato, S., Yagi, T., Aizawa, S., & Yamamoto, T. (1994). Initial events of myelination involve Fyn tyrosine kinase signaling. *Nature*, 367, 572-576.
- Van Buren, J. M., & Borke, R. C. (1971). A re-evaluation of the « nucleus ventralis lateralis » and its cerebellar connections. A study in man and chimpanzee. *Int. Journal of neurology*, 8 (2), 155-177.
- Vanderklish, P., Saido, T. C., Gall, C., & Lynch, G. (1995). Proteolysis of spectrin by calpain accompanies theta-burst stimulation in cultured hippocampal slices. *Mol. Brain Research*, 32, 25-35.
- Walsh, M.J., & Kuruc, N. (1992). The postsynaptic density : constituent and associated proteins characterized by electrophoresis, immunoblotting, and peptide sequencing. *Journal of Neurochemistry*, 59, 667-678.
- Wang, L. Y., Salter, M. W., & MacDonald, J. F. (1991). Regulation of kainate receptors by cAMP-dependent protein kinases and phosphatases. *Science*, 253, 1132-1135.
- Weisz, D. J., Clark, T. W., & Thompson, R. F. (1984). Increased activity of dentate granule cells during nictitating membrane response conditioning in rabbits. *Behavior in Brain Research*, 12, 145-154.
- Williams, J. H., & Bliss, T. V. (1988). Induction but not maintenance of calcium-induced long-term potentiation in dentate gyrus and area CA<sub>1</sub> of the hippocampal slice is blocked by nordihydroguaiaretic acid. *Neuroscience Letters*, 88, 81-85.

- Williams, J. H., & Bliss, T. V. (1989). An in vitro study of the effect of lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibitors of arachidonic acid on the induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *Neuroscience Letters*, 107, 1-3.
- Wilson, C. J. (1988). Cellular mechanisms controlling the strenght of synapses. *J. Electron Miscrosc. Tec.*, 10, 293.
- Xie, X., Berger, T. W., & Barrionuevo, G. (1992). Isolated NMDA receptor-mediated synaptic responses express both LTP and LTD. *Journal of neurophysiology*, 67, 1009-1013.
- Zalutsky, R. A., & Nicoll, R. A. (1990). Comparaison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science*, 248, 1619-1624.
- Zola-Morgan, S., Squire, L. R., & Amaral, D. G. (1986). Human amnesia and the medial temporal region : enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *Journal of neuroscience*, 6(10), 2950-2967.
- Zheng, F., & Gallagher, J. P. (1992). Metabotropic receptors are required for the induction of long-term potentiation. *Neuron*, 9, 163-172.
- Zwaal, R. F., Bevers, E. M., Comfurius, P., Rosing, J., Tilly, R. H. J., & Verhallen, P. F. J. (1989). Loss of membrane phospholipid asymmetry during activation of blood platelets and sickled red cells; mechanisms and physiological significance. *Molecular and cellular biochemistry*, 91, 23-31.